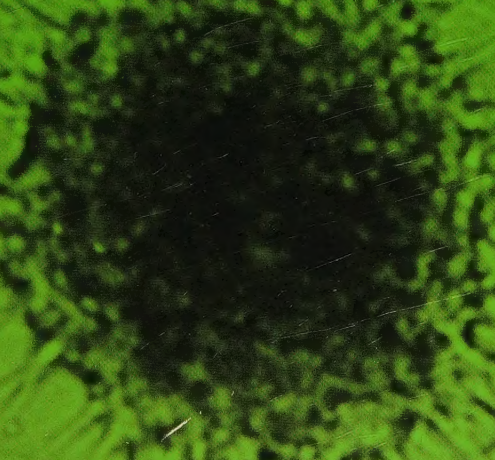


TUMORANTIGENE

A black and white micrograph of a tumor cell, showing a dense, dark, circular nucleus with a prominent nucleolus, surrounded by a lighter, granular cytoplasm. The cell is centered on the cover, with the title 'TUMORANTIGENE' above it and the subtitle below it.

Nachweis in menschlichen Melanomen
Gliomen und Nierenkarzinomen
— Klinische Relevanz —

1979

JÖRG G. D. BIRKMAYER



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551912_0013

Aus dem
INSTITUT FÜR CHIRURGISCHE FORSCHUNG
(Vorstand: Prof. Dr. Dr. h. c. W. Brendel)
an der
CHIRURGISCHEN KLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN
(Direktor: Prof. Dr. G. Heberer)

TUMORANTIGENE

NACHWEIS IN MENSCHLICHEN MELANOMEN,
GLIOMEN UND NIERENKARZINOMEN
– KLINISCHE RELEVANZ –

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
DR. JÖRG D. BIRKMAYER
aus Wien

– München, Frühjahr 1979 –

Mit Genehmigung des Fachbereiches Medizin
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Alle Rechte vorbehalten

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. med. h. c. W. Brendel
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. G. Riethmüller
Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der Promotion: 2. August 1979



*Dem Entdecker der kausalen Therapie
der Parkinson'schen Krankheit
meinem Vater
in Dankbarkeit und Verehrung
gewidmet*

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. PROBLEMSTELLUNG	12
3. ERGEBNISSE	17
3.1. Untersuchungen an Melanomen	17
3.1.1. Isolierung und Charakterisierung von Zellmembranen	17
3.1.2. Identifizierung tumor-assoziiierter Komponenten	19
3.1.3. Nachweis der Tumorspezifität	27
3.1.4. Kreuzreaktion des Antimelanomserums mit Melanom-, Gliom- und Nierenkarzinomantigenen	31
3.1.5. Nachweis von tumorspezifischen Membranantigenen bei in vitro gezüchteten Melanomzellen	33
3.2. Untersuchungen an Gliomen	40
3.2.1. Isolierung und Charakterisierung von Zellmembranen	40
3.2.2. Identifizierung tumor-assoziiierter Komponenten	42
3.2.3. Nachweis der Tumorspezifität	50
3.2.4. Nachweis tumor-assoziiierter Membranantigene bei in vitro gezüchteten Gliomzellen	53
3.3. Untersuchungen an Nierenkarzinomen	58
3.3.1. Identifizierung tumor-assoziiierter Komponenten	58
3.3.2. Nachweis tumorspezifischer Antigene bei in vitro gezüchteten Nierenkarzinomzellen	61
3.4. Immunologische Untersuchungen von menschlichen Seren	63
3.4.1. Nachweis tumorspezifischer zirkulierender Antikörper im Serum von Melanompatienten	63

3.4.2.	Nachweis tumorspezifischer zirkulierender Antikörper im Serum von Gliompatienten	65
3.4.3.	Nachweis tumorspezifischer zirkulierender Antikörper im Serum von Nierenkarzinompatienten	67
4.	DISKUSSION	70
4.1.	Zelluläre und humorale Immunabwehr bei malignen Tumoren	70
4.2.	Das immunologische Überwachungssystem und die tumorspezifischen Ausschaltungsmechanismen	79
4.3.	Die Regulation des Immunsystems	90
4.4.	Tumor-asoziierte Antigene	93
4.5.	Immunstatus	101
4.6.	Immuntherapie	105
5.	ZUSAMMENFASSUNG	115
5.1.	Befunde beim Melanom	115
5.2.	Befunde beim Gliom	115
5.3.	Befunde beim Nierenkarzinom	116
6.	MATERIAL UND METHODEN	117
6.1.	Tumormaterial	117
6.1.1.	Melanomgewebe	117
6.1.2.	Gliomgewebe	117
6.1.3.	Nierenkarzinom- und Normalnierengewebe	118
6.2.	Präparation der Zellmembranen	118
6.2.1.	Zellmembrangewinnung aus menschlichem Melanomgewebe	119
6.2.2.	Zellmembrangewinnung aus menschlichen Gliomen	120
6.2.3.	Zellmembrangewinnung aus menschlichem Nierengewebe	121
6.2.4.	Zellmembrangewinnung aus in vitro gezüchteten Tumorzellen	122

	<i>Seite</i>
6.3. Gewinnung der Ultraschall-löslichen Membranproteine	123
6.4. Gewinnung der Triton-X-100 löslichen Membranproteine	124
6.5. Elektrophoretische Analyse auf Polyacrylamidgelen	124
6.5.1. Probenverarbeitung	124
6.5.2. Herstellen der Polyacrylamidgele	125
6.6. Methoden der Zellzüchtung	127
6.6.1. Anlegen von Primärkulturen menschlicher Melanome	127
6.6.2. Anlegen von Primärkulturen menschlicher Gliome	129
6.6.3. Anlegen von Primärkulturen menschlicher Nierenkarzinome und normaler Nierenparenchymzellen	129
6.6.4. Subkultivieren (Passagieren) von Primärkulturen	130
6.7. Immunologische Methoden	133
6.7.1. Immunisierungsschema bei Kaninchen	133
6.7.2. Gewinnung des Antiserums und der Immunglobulinfraktion	134
6.7.3. Immundoppeldiffusionstest	135
6.7.4. Gegenstromelektrophorese auf Agaroseplatten	136
6.7.5. Immunfluoreszenz	137
6.8. Elektronenmikroskopie	138
7. LITERATURVERZEICHNIS	140

1. E I N L E I T U N G

Das entscheidende Kriterium einer lebenden Zelle ist ihre Abgrenzung gegenüber der Umwelt. Gleichzeitig benötigt sie diese. Muß daher mit ihr kommunizieren. Diese Notwendigkeit ergibt sich aus den geordneten chemischen und physikalischen Prozessen, die im Inneren einer Zelle ablaufen müssen, um die Energie für die eigene Vermehrung und Regeneration zu liefern. Um überhaupt am Leben zu bleiben, muß die Zelle die mehr gesetzmäßigen Abläufe von den ungeordneten chaotropen Vorgängen der Umwelt abgrenzen. Dazu bildet die Zelle Barrieren aus, die ganz selektiv nur für bestimmte Stoffe oder Moleküle durchlässig sind, wobei die Permeabilität von der Zelle selbst steuerbar ist. Kybernetisch ausgedrückt bedeutet dies, daß die Zelle über Regler verfügen muß, die die extremen Schwankungen der Außenwelt auf ein für sie selbst verkraftbares Mindestmaß reduzieren, jedoch gleichzeitig die selektive Aufnahme der für ihr Überleben essentiellen Stoffe gestatten.

Die primären Fühler dieses Regelkreises sitzen in der Zellmembran und bestimmen die biologischen und sozialen Eigenschaften einer Zelle, wie Wachstum, Vermehrung, Ausbreitung und interzelluläre Kommunikation.

Biochemisch gesehen sind diese Regler Makromoleküle vom Typ der Proteine, Lipide und Polysaccharide oder deren Kombination, also Lipoproteine, Glykoproteine und Glykolipide. Auf Grund ihrer Evolution und der phylogenetischen Entwicklung zeigen diese Membranbausteine Eigenschaften, die es erlauben, eine Zelle von verschiedenen Organismen sowie verschiedene Zellen eines Organismus zu unterscheiden.

Prinzipiell kann man 3 Arten von Zellmembran-Antigenen unterscheiden: artspezifische (A), gewebespezifische (G) und zellspezifische (Z) (Abb. 1.1).

Die artspezifischen Antigene stellen gewissermaßen die Identitätskarte eines Individuums dar. Es ist sicherlich

eine Gruppe von Antigenen, die es gestattet, Zellen einer bestimmten Tierart zuzuordnen. Mäuse, Katzen, Affen, Menschen und andere Tiergattungen haben unterschiedliche artspezifische Antigene. Dies konnte unter anderem auch durch die unterschiedlichen Hüllenproteine von Viren nachgewiesen werden, die sich aus der Wirtsspezifität der einzelnen Viren ergibt. Auch die Blutgruppensubstanzen können trotz ihrer Individualspezifität zu den artspezifischen Antigenen gerechnet werden.

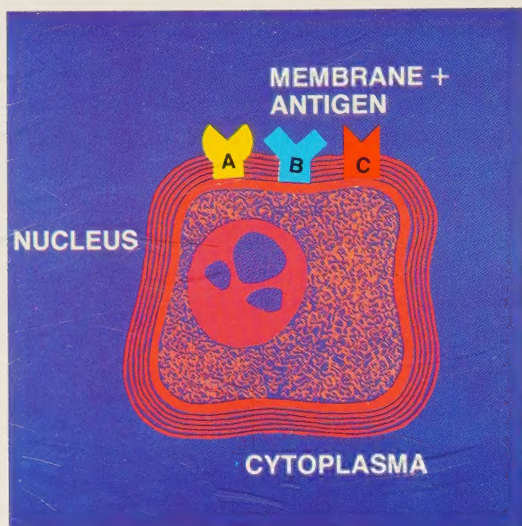


Abb. 1.1: Schematisches Bild einer Zelle mit Zellmembran, Nucleus und Cytoplasma

An der Zellmembran finden sich im wesentlichen 3 Gruppen von Antigenen: (A) artspezifische, (B) gewebespezifische und (C) zellspezifische.

Auch die im Zuge der Transplantationsforschung entdeckten Histokompatibilitätsantigene oder "H-Antigene" (Snell, 1957) gehören zu den artspezifischen, obwohl sie den gewebespezifischen Antigenen nahestehen.

Die gewebespezifischen Antigene charakterisieren ein bestimmtes Organ oder genauer die Organabstammung einer bestimmten Zelle. Mit ihnen lassen sich Leber-, Nieren-, Muskel- oder Nervengewebe identifizieren, wobei indirekt auch Rückschlüsse auf den Differenzierungsgrad möglich sind. Bisher sind nur ganz wenige gewebespezifische Antigene in ihrer Struktur, Funktion und Organspezifität aufgeklärt.

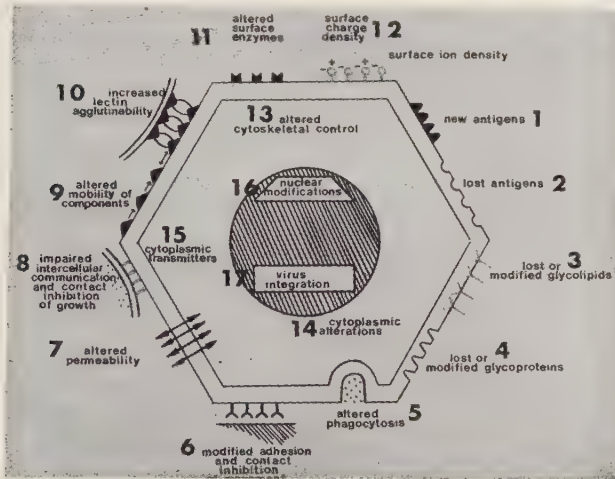


Abb. 1.2: Biochemische, physikalische und biologische Veränderungen einer Tumorzelle

Sie sind der numerischen Reihenfolge nach in Tabelle 1 aufgelistet.

Zur Gruppe der zellspezifischen Antigene gehören jene Makromoleküle, die mit der Zellproliferation und dem Phänomen der Kontaktinhibition in Beziehung stehen. Über sie laufen die Informationen aus dem extrazellulären Raum an die zentrale Schaltstelle, den Zellkern. Sind diese zellspezifischen Antigene verändert, ist auch die Regulation der Zelle

gestört. Bemerkbar macht sich dies vor allem in einer gesteigerten Wachstumsrate sowie im Verlust der Kontaktinhibierung, ein Phänomen, das pathologisch als infiltratives Wachstum in Erscheinung tritt. Daneben gibt es eine Reihe biochemischer und biologischer Eigenschaften, die eine neoplastische von einer normalen Zelle unterscheiden (Abb. 1.2).

Am charakteristischsten für eine Tumorzelle ist das Auftreten neuer Antigene. Diese "Neo"-Antigene können als tumorspezifisch angesehen werden, weil sie in normalen Zellen fehlen (Burnett, 1973; Dumonde, 1966; Haywood und McKhamm, 1971).

Für ihre Entstehung werden verschiedene Mechanismen diskutiert, die sich in den zahlreichen Theorien der Krebsentstehung niedergeschlagen haben.

Allgemein akzeptiert ist die Tatsache, daß die Proteinsynthese und ihre Regulation bei der neoplastischen Zellumwandlung eine zentrale Rolle spielt. Vergegenwärtigt man sich den molekularen Ablauf der Proteinsynthese, ist einleuchtend, daß sie auf drei verschiedenen Ebenen regulierbar und durch äußere Faktoren wie Karzinogene beeinflussbar ist: 1. auf der Ebene der Transkription, das heißt der

Übersetzung von DNA in RNA

2. auf der Ebene der Translation, das heißt bei der Übertragung von RNA-Information in Protein

3. auf der Ebene der enzymatisch aktiven Proteine.

Auf der ersten Ebene kann das gesamte Spektrum physikalischer, chemischer und biologischer Karzinogene angreifen. Energiereiche Strahlen als physikalische, organische und anorganische Verbindungen, als chemische und Viren als biologische Karzinogene sind imstande, Mutationen in der DNA, dem genetischen Material jeder Zelle hervorzurufen. Durch Transkription dieser veränderten DNA wird eine alterierte Matrizen-RNA gebildet, die Anlaß zu neuen oder veränderten Eiweißmolekülen gibt.

*Tabelle 1: Biochemische, physikalische und biologische
Veränderungen einer Tumorzelle*

A. Biochemisch-physikalische Eigenschaften:

- 1. Neue tumorassoziierte Antigene*
- 2. Verlust normaler Zellmembranantigene*
- 3. Verlust oder Veränderung der Membranglykolipide*
- 4. Verlust oder Veränderung der Membranglykoproteine*
- 5. Unterschiedlicher Phagozytosemechanismus*
- 6. Veränderte Haftfähigkeit (Fehlen von "Tight-Junctions")*
- 7. Veränderte Permeabilität der Zellmembran*
- 8. Gestörte interzelluläre Kommunikation mit Verlust der
Kontaktinhibierung*
- 9. Alterierte Beweglichkeit der Membrankomponenten*
- 10. Erhöhte Agglutinierbarkeit durch Lektine*
- 11. Veränderte Oberflächenenzyme*
- 12. Veränderte Oberflächenladung und -ladungsdichte*
- 13. Veränderte Kontrolle des Zytoskelettes*
- 14. Veränderte Zytoplasmastruktur (Gel-Solzustand)*
- 15. Neue oder alterierte zytoplasmatische Transmitter*
- 16. Modifikation des Zellkerns und der Chromatinstruktur*
- 17. Integration eines Virusgens in das Zellgenom
(virusspezifische DNA-Sequenzen in der chromosomalen
DNA, sowie virusspezifische M-RNA im Zytoplasma)*

B. Biologische Eigenschaften:

- 1. Wachstum mit unbeschränkter Sättigungsdichte*
- 2. Reduzierter Serum- (= Wachstumsfaktor-)bedarf in vitro*
- 3. Wachstum in Agar oder Methocel-Suspension*
- 4. Wachstum auf Monolayer normaler Zellen*
- 5. Tumorbildung nach Injektion in kompatible Tiere*

Eine veränderte m-RNA kann auch direkt durch Infektion mit einem Virus entstehen, und ihre anschließende Übertragung führt ebenfalls zur Bildung zusätzlicher Makromoleküle. Dadurch entstehen die tumorspezifischen Antigene, die in allen Zellkompartimenten vorkommen können.

Für den Organismus am wichtigsten sind die Neoantigene der Zellmembran, die sogenannten tumorspezifischen Oberflächenantigene, abgekürzt TSSA (Warnatz, 1975). Sie wecken primär die Immunantwort des Individuums, das seine lymphatischen Effektorzellen, die T- und B-Lymphozyten, aktiviert.

Vor allem die Forschungen auf dem Gebiet der viralen Karzinogenese haben in den letzten Jahren wichtige Einsichten über die Krebsentstehung geliefert. So gilt die virale Genese einer Reihe tierischer Tumoren, wie Katzen- (Snyder und Theilen, 1963) und Mäuseleukämie (Gross, 1951; Friend, 1957; Graffi, 1957), Mäusemammatumoren (Mühlböck und Bentvelzen, 1969), Rattensarkome und -gliome (Kumanishi und Yamamoto, 1970) sowie Affenlymphomen und -sarkomen (Kawakami et al., 1972; McAllisten et al., 1971; Deinhardt, 1970) heute als bewiesen.

Bei diesen Tumoren konnten die Kochschen Postulate über ein infektiöses Agens als Ursache einer Krebserkrankung erfüllt werden. Die Problematik bei menschlichen Krebserkrankungen ergibt sich direkt aus den 3 Forderungen Kochs:

1. Das kausale Agens (Virus) muß im erkrankten Gewebe nachweisbar sein.
2. Es muß isoliert und vermehrt werden können.
3. Es muß eine gleichartige Erkrankung (Krebs) hervorrufen, bei der eine neuerliche Produktion des infektiösen Agens nachweisbar sein sollte.

Alle diese Kriterien sind für Tumroviren deshalb schwer zu erfüllen, weil sich ihre Biologie und ihr Vermehrungsmechanismus wesentlich von dem einer lebenden Zelle wie eines Bakteriums oder eines Pilzes unterscheidet.

Bei den DNA-Tumurviren schließen sich die Phänomene der Vermehrung und der Zelltransformation gegenseitig aus. Diese Viren reifen im Zellkern aus, wobei dieser selbst und damit die ganze Zelle zugrunde geht. Man nennt die DNA-Virusvermehrung deshalb auch produktive oder lytische Infektion; produktiv, weil neue Viren produziert werden und lytisch, weil die Zelle dabei aufgelöst wird. Eine lysierte Zelle kann aber nie mehr neoplastisch umgewandelt werden. Andererseits kann eine transformierte Zelle keine DNA-Viren produzieren, weil sie dabei zugrunde gehen würde. Aus diesem Grund sind in DNA-Virus transformierten Zellen, also in Tumorzellen, keine Viren nachweisbar.

Ähnlich ist die Situation bei den RNA-Tumurviren. Hier sind die Prozesse der Virusreplikation und der malignen Zellumwandlung nicht unbedingt miteinander gekoppelt. So können sich RNA-Tumurviren in einer Zelle vermehren, ohne daß diese neoplastisch wird. Andererseits kann eine Zelle durch RNA-Viren transformiert werden, ohne daß sich in ihr Viren bilden. Nur im Idealfall wird die Zelle transformiert bei gleichzeitiger Virusvermehrung. Die Gründe für diese Phänomene liegen zunächst im Virusgenom selbst. Je nachdem wie komplett sein Genom ist, kann es die Zelle transformieren und sich in ihr vermehren, vorausgesetzt die Zelle ist empfänglich für dieses spezielle Virus (Abb. 1.3). Der Wildtyp besitzt das vollkommene Genom und ist imstande, zu transformieren und sich zu vermehren (Abb. 1.3 A). Virusmutanten, denen ein oder mehrere Gene für Viruskomponenten fehlen, können die Zelle zwar transformieren, sich aber nicht mehr vermehren, da nicht alle seine Bausteine in der Zelle synthetisiert werden (Abb. 1.3 B). Fehlt bestimmten Mutanten hingegen das Onkogen, jenes Gen, das die Information für die maligne Zellumwandlung enthält, so können sich diese Viren zwar vermehren, die Zelle aber nicht transformieren (Abb. 1.3 C). Daraus läßt sich ableiten, daß der Nachweis von Viruskomponenten nicht gleichzeitig ein Beweis für einen Tumor ist.

Schließlich gibt es Mutanten, die Zellen nicht transformieren können und sich auch nicht vermehren können. Man kann sie jedoch auf Grund ihrer genetischen und immunologischen Eigenschaften nachweisen.

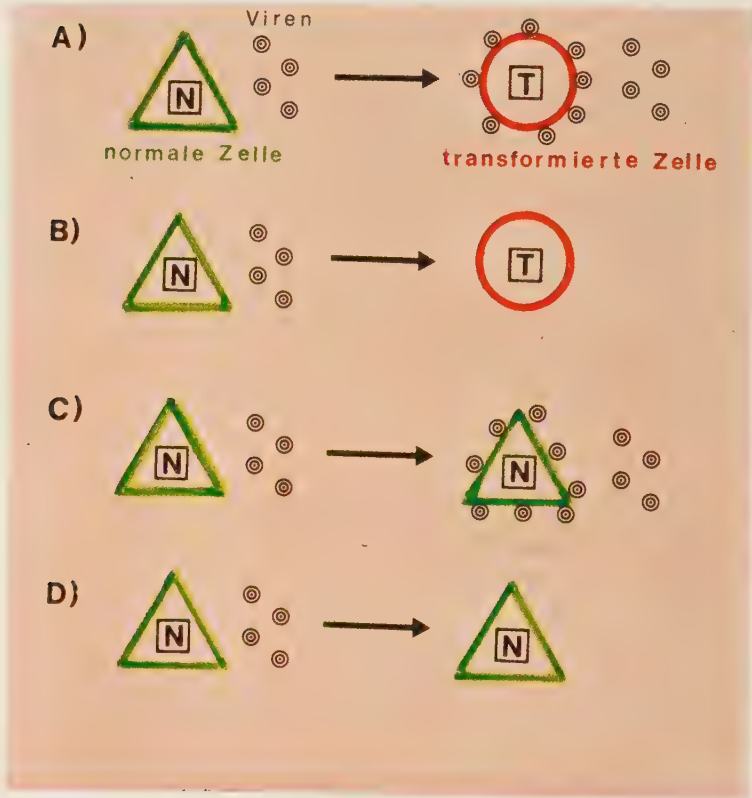


Abb. 1.3: Möglichkeiten der Wechselwirkung onkogener RNA-Viren mit empfindlichen Zellen

Die grünen Dreiecke stellen normale Fibroblasten dar, die durch RNA-Tumoviren infiziert werden können. Die roten Kreise repräsentieren transformierte Zellen. Es gibt 4 Arten von Virusmutanten:

- (A) Wildtyp: Transformation (+), Virusreplikation (+)
- (B) R-Mutanten: Transformation (+), Virusreplikation (-)
- (C) T-Mutanten: Transformation (-), Virusreplikation (+)
- (D) RT-Mutanten: Transformation (-), Virusreplikation (-)

Die entscheidenden Vorgänge, die nach der Infektion einer Zelle durch ein onkogenes RNA-Virus auftreten, sind schematisch auf Abb. 1.4 dargestellt.

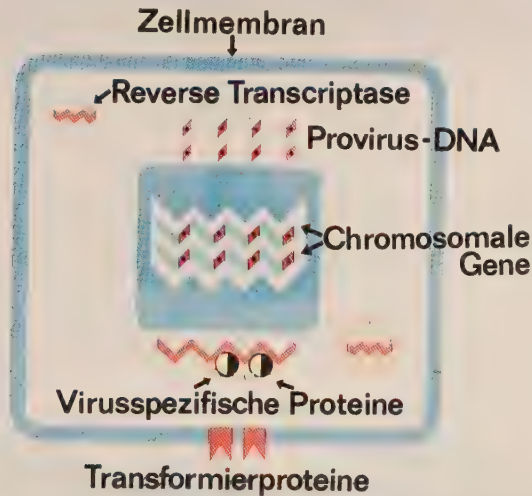


Abb. 1.4: Schema zur Zelltransformation durch onkogene RNA-Viren

Nach Eindringen des Virus in die Zelle und dem Abbau seiner Hülle wird die virale RNA mit Hilfe eines viruseigenen Enzyms, der "Reversen Transcriptase", in "Provirus-DNA" umgewandelt. Anschließend wird diese DNA verdoppelt und in die chromosomale DNA integriert. Die viralen Gene können wie so viele zelluläre Gene inaktiviert beziehungsweise reprimiert sein. Kommt es jedoch zur Expression viraler Gene, werden viruspezifische oder viruscodierte Proteine synthetisiert. Dazu gehören auch die Transformierproteine, die für die Entstehung und Aufrechterhaltung des transformierten Zustandes notwendig sind. Je nachdem welche Gene in der virus-infizierten Zelle dereprimiert werden, kommt es zur Virusproduktion und (oder) zur Zelltransformation.

Nach Eindringen des Virus in die Zelle und dem Abbau seiner Hülle wird die virale RNA mit Hilfe eines viruseigenen Enzyms, der "Reversen Transcriptase", in "Provirus-DNA" umgewandelt. Anschließend wird diese verdoppelt und in die chromosomale DNA integriert. Die viralen Gene können wie viele zelluläre Gene inaktiviert beziehungsweise reprimiert sein. Kommt es jedoch zur Expression viraler Gene, werden virusspezifische oder viruscodierte Proteine synthetisiert. Dazu gehören auch die Transformationsproteine, die für die Entstehung und Aufrechterhaltung des transformierten Zustandes notwendig sind. Je nachdem, welche Gene in der virus-infizierten Zelle dereprimiert werden, kommt es zur Virusproduktion und (oder) zur Zelltransformation.

Aus den hier diskutierten Gründen ist es schwierig, die Kochschen Postulate bei menschlichen Krebserkrankungen zu erfüllen. Vor allem das 3. und entscheidende Kriterium, die zellfreie Übertragung einer menschlichen Krebsgeschwulst, bereitet unüberwindbare Schwierigkeiten.

Man kann jedoch nach Indizien suchen, die für eine Beteiligung eines Virus bei menschlichen Neoplasien sprechen. Solche Hinweise sind bei menschlichen Leukämien (Gallagher und Gallo, 1975; Mak et al., 1975; Nooter et al., 1975; Birmayer et al., 1978), Lymphomen (Spiegelman et al., 1972), Mammakarzinomen (Bowen et al., 1973), Melanomen (Birmayer et al., 1974a, 1975; Parson et al., 1974), Gliomen (Cuatrecasas et al., 1973; Birmayer et al., 1974b,c, 1976), Prostata-Karzinomen (Dmochowski et al., 1976) und Osteosarkomen (Morton und Malmgreen, 1968; Pritchard et al., 1971) sowie anderen Sarkomen (Morton und Malmgreen, 1969) erhalten worden.

Von besonderer Bedeutung in diesem Zusammenhang ist eine Beobachtung, daß alle durch ein bestimmtes Virus induzierten tierischen Tumoren ein identisches tumorspezifisches Oberflächenantigen (TSSA) ausbilden, unabhängig von der Histologie des Tumors und dem Organ, in dem sich der neoplastische

Prozeß entwickelt (Brandis, 1975; Warnatz, 1975). Nachdem TSSAs ein essentieller Bestandteil einer Tumorzelle sind, Virusproteine jedoch nicht notwendige Komponenten darstellen, ist der Nachweis des TSSA das wichtigste molekularebiologische Indiz für eine Krebszelle. Auf menschliche Neoplasien bezogen, bedeutet dies, daß Tumoren mit identischen TSSAs von ein und demselben Tumovirus induziert worden sind. Mit dem Nachweis identischer tumorspezifischer Membranantigene in menschlichen Malignomen könnte man indirekt die virale Ätiologie dieser Neoplasien beweisen.

2. P R O B L E M S T E L L U N G

Aus den hier dargelegten Prämissen leitet sich die Problemstellung der vorliegenden Arbeit ab. Sie kann in 3 Fragen gegliedert werden:

1. Gibt es menschliche Tumoren mit gleichen gemeinsamen Antigenen?
2. Lassen sich diese Antigene in ihrer Struktur und Funktion aufklären?
3. Welche klinische Relevanz hätten solche allgemeine tumorspezifischen Antigene für die Diagnostik und Therapie menschlicher Krebserkrankungen?

Die Planung der Experimente ergab sich direkt aus diesen 3 Fragen. Zunächst war es das Ziel, spezifische Antigene in verschiedenen Tumoren nachzuweisen. Dann sollte ihre biochemische und immunologische Verwandtschaft oder Identität festgestellt werden. Danach stand die Isolierung und Charakterisierung im Vordergrund. Für die klinische Relevanz wäre es notwendig, spezifische Antikörper dagegen herzustellen, mit denen man analoge Antigene auch in anderen menschlichen Malignomen identifizieren könnte.

Bei der Ausarbeitung des experimentellen Planes ergaben sich primär zwei Hauptschwierigkeiten:

1. Wie lassen sich tumorspezifische Antigene nachweisen, wenn ihre Funktion bis heute nicht bekannt ist und es deshalb auch keinen Test zu ihrem Nachweis gibt?
2. Welche menschlichen Neoplasien sollte man präferentiell untersuchen?

Das erste Problem war direkt nicht lösbar.

Bei der Auswahl der Malignome wurden als erste jene in Betracht gezogen, bei denen virale Eigenschaften biochemisch nachgewiesen werden konnten. Aus praktischen und technischen Gründen wurden jene ausgewählt, bei denen große Mengen an Gewebe erhalten werden konnten. Das Problem

mit der Tumormenge wurde außerdem durch *in vitro*-Kultur von Tumorzellen in größerem Ausmaß zu lösen versucht, um damit kontinuierlich Material zur Antigengewinnung zur Verfügung zu haben.

Folgende menschliche Malignome wurden präferentiell untersucht: das Melanom, das Gliom und das Nierenkarzinom.

Das Melanom (Abb. 2.1) stand im Mittelpunkt des Interesses, weil es auf Grund seiner starken Metastasierungstendenz unter anderem auch ins Gehirn eine besonders ungünstige Verlaufsprognose hat. Andererseits zeigt es eine im Vergleich

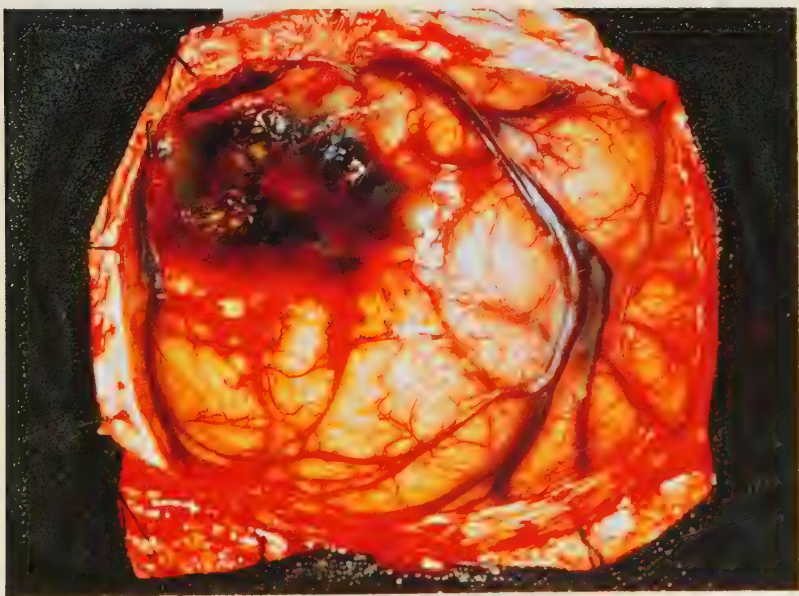


Abb. 2.1: Hirnmetastase eines malignen Melanoms.

Von diesem Tumor konnte eine permanente Zelllinie etabliert werden, die nach Kryopräservierung jederzeit zur Verfügung steht.

zu anderen Tumoren relativ hohe Spontanremissionsrate, welche darauf hindeutet, daß es Abwehrmechanismen gibt, die im Kampf gegen den Tumor die Oberhand behalten. Dieses pathophysiolo-

gisch bisher ungeklärte Phänomen der spontanen Rückbildung würde der Kliniker nur allzu gerne simulieren und als mögliche Immuntherapie einsetzen.

Die unter dem Sammelbegriff Gliome zusammengefaßten Hirntumoren mit den häufigsten Vertretern dem Glioblastom multiforme (Abb. 2.2), dem Astrozytom und dem Oligodendrogliom, zeichnen sich durch eine besonders infauste Prognose aus. Bedingt ist dies im wesentlichen durch 2 Aspekte:

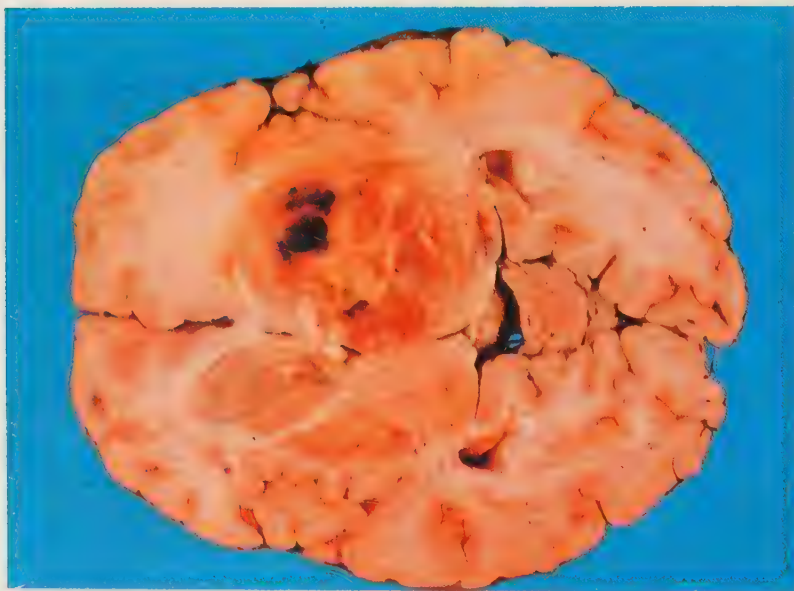


Abb. 2.2: Pathologisches Präparat eines multiformen Glioblastoms

1. Der Raumforderung im Gehirn sind sehr enge Grenzen gesetzt. (So führt eine mehr als 15%ige Volumenzunahme im Gehirn durch die knöcherne Ummantelung meist zu einer letalen Einschränkung der Vitalfunktionen.)
2. Gerade bei den multilokulären Hirntumoren ist die therapeutische Beeinflußbarkeit äußerst unbefriedigend.

Deshalb wird ständig nach neuen Behandlungskonzepten gesucht, wobei die auf immunologischer Basis auf besonderes Interesse stoßen, da die chemotherapeutischen Versuche bisher nicht den erhofften Erfolg brachten.

Das Nierenkarzinom (Abb. 2.3) neigt ähnlich wie das Melanom zu weitläufiger Metastasierung und ebenso auch zur spontanen Rückbildung wenn auch nur in ganz vereinzelt Fällen. So wurde wiederholt berichtet, daß nach Entfernung



Abb. 2.3: Präparat eines menschlichen Nierenkarzinoms

des Primärtumors durch Nephrektomie bereits manifeste Lungenmetastasen verschwanden. Diese Befunde sprechen sehr für eine Beteiligung des Immunapparates. Der experimentelle Vorteil des Nierenkarzinoms gegenüber dem Melanom liegt erstens in der meist größeren Tumormasse sowie in der meist ausreichenden Menge an Normalnierengewebe. Gerade das fehlende Vergleichsgewebe stellt beim malignen Melanom ein Problem dar. Der Plan für das experimentelle Vorgehen gliederte sich in 4 Abschnitte:

1. Es wurde zunächst versucht, Proteine bzw. Antigene in den betreffenden Tumoren biochemisch oder immunologisch nachzuweisen. Die Tumorspezifität sollte dadurch bewiesen werden, daß sich diese Antigene in Normalgewebe nicht nachweisen lassen.
2. Die Isolierung sollte auf zellbiologischen, die Charakterisierung auf biochemischen und immunologischen Wegen erfolgen.
3. Zur Struktur und Funktionsaufklärung sollten die Antigene kontinuierlich und in ausreichender Menge zur Verfügung stehen, was durch Massenproduktion von Tumorzellen in der Gewebekultur zu lösen versucht wurde.
4. Schließlich war im Hinblick auf eine mögliche klinische Relevanz geplant, Patientenserum auf Tumorantigene bzw. dagegen gerichtete zirkulierende Antikörper zu untersuchen.

3. E R G E B N I S S E

3.1. Untersuchungen an Melanomen

3.1.1. Isolierung und Charakterisierung von Zellmembranen

Die Zellmembran maligner Tumoren ist deshalb von besonderer Relevanz, weil sie die tumorspezifischen Oberflächen-antigene, abgekürzt "TSSA", enthält und dadurch primär den lymphatischen Effektorzellen sowie den zirkulierenden Antikörpern zugänglich ist. Für den Begriff "Zellmembran" kann synonym "Plasmalemm" verwendet werden. Dagegen sind die Worte Oberflächenmembran und Plasmamembran unklare Begriffe, die sich aus der Übersetzung der angelsächsischen Bezeichnungen eingebürgert haben. Unter Plasmamembranen fallen alle Membranen des Zytoplasmas, also auch die des Golgi-Apparates, des endoplasmatischen Retikulums oder der Exo- und Endozytosebläschen. Diese vorangestellte Begriffsdefinition dient nur zum besseren Verständnis der Materie.

Aus menschlichen Melanomen konnten, nach Homogenisation des Gewebes, durch differentielle und anschließender Dichtegradienten-Zentrifugation Zellmembranen isoliert werden. Die ultrastrukturelle Analyse dieser Präparationen zeigte eine relativ homogene Membranfraktion, die keine Verunreinigung durch Kernmaterial, Mitochondrien oder Mikrosomen erkennen ließ (Abb. 3.1). Die zahlreichen Bläschen unterschiedlicher Größe dürften sehr wahrscheinlich auf Reaggregation von Membranbruchstücken zurückzuführen sein. Bei besonders pigmentreichen Tumoren sah man gelegentlich besonders elektrodichte Granula, die von Melanosomen oder Prämelanosomen stammen könnten.

Das für Zellmembranen typische Enzym, die Natrium-Kalium-abhängige ATPase war in dieser Zellfraktion etwa 8fach gegenüber dem Homogenat angereichert.

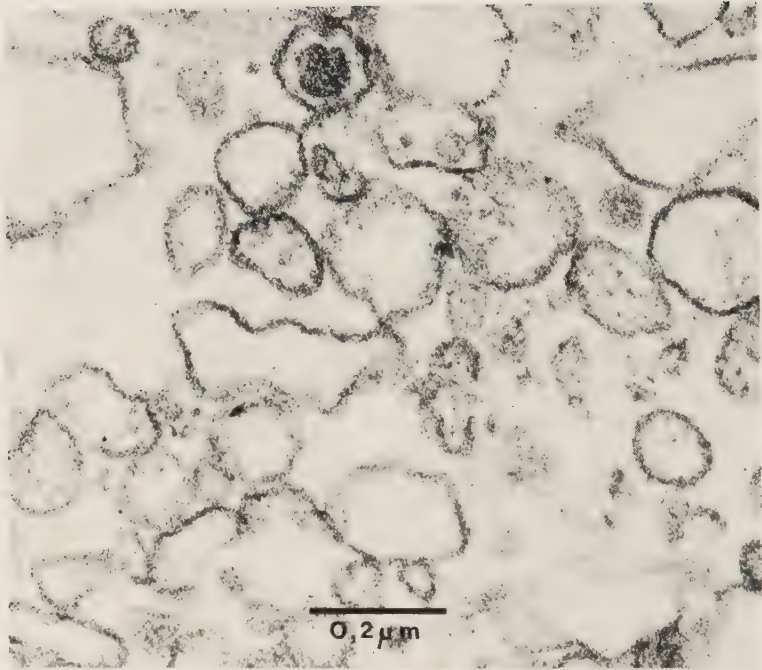


Abb. 3.1: Elektronenmikroskopische Aufnahme der Zellmembranfraktion eines malignen Melanoms

Man erkennt Membranen und Vesikel unterschiedlicher Größe. Bei dieser Vergrößerung ist die Auftrennung der Membran in drei Schichten (eine elektronendichte, eine elektronentransparente und nochmals eine elektronendichte) klar zu sehen. Die unscharfen Areale beruhen auf dem Effekt, der durch das tangentielle Anschneiden der Bläschen entsteht, wodurch kein oder nur ein sehr geringer relativer Kontrastunterschied entsteht. Verunreinigungen durch andere zytoplasmatische Komponenten wie Kerne, Nukleoli, Mitochondrien oder Mikrosomen sind nicht zu erkennen.

3.1.2. Identifizierung tumor-assoziiertter Komponenten

Nachdem beim Melanom Vergleichsgewebe in Form von normalen Melanozyten nicht in ausreichender Menge zur Verfügung stand, mußte zur Identifizierung eventuell vorkommender tumor-assoziiertter Proteine der immunologische Weg eingeschlagen werden. Diesem Vorgehen lag das Konzept zu Grunde, daß ein Antiserum gegen Tumormembranen hergestellt werden sollte. Dieses Antiserum müßte Antikörper gegen Membrankomponenten enthalten. Wenn in der Membran tumorspezifische Proteine vorhanden wären, müßten auch dagegen gerichtete Antikörper gebildet werden.

Nachdem Membranen selbst ein relativ schlechtes Immunogen darstellen, wurde mit löslichen Membrankomponenten gearbeitet, die entweder durch Beschallen in physiologischer Kochsalzlösung oder durch Solubilisierung mit dem nicht-ionischen Detergens Triton X-100 erhalten wurden.

Zunächst wurde ein Antiserum gegen den Schallextrakt hergestellt und im Immundiffusionstest untersucht. Wie zu erwarten, enthielt dieses Antiserum Antikörper gegen mehrere Proteine, von denen einige auch in normalen Zellen vorkommen. Deshalb wurde das Antiserum an normales menschliches Serum, anschließend an Schallextrakte von Erythrozyten und Lymphozyten adsorbiert, um die Antikörper gegen die Normalproteine zu präzipitieren und damit zu entfernen. Die Adsorptionsschritte wurden so oft wiederholt, bis keine Präzipitationslinie gegen Extrakte von Normalgewebe mehr nachweisbar waren. Das auf diese Weise adsorbierte von Antikörper gegen Normalproteine befreite Serum reagierte in Form von zwei Banden mit dem Schallextrakt der Melanommembranen, gegen welches es hergestellt wurde (Abb. 3.2). Daraus ließ sich folgern, daß das Serum Antikörper gegen zwei Proteine enthielt, die im normalen Gewebe nicht nachweisbar waren. Die Annahme lag nahe, daß es sich um tumor-assoziierte Proteine handelte.

Die nächste Frage, die sich aus diesem Befund ableitete, lautete: Sind die Antikörper gegen Antigene eines ganz bestimmten Melanoms gerichtet, oder handelt es sich hierbei um allgemein melanom-spezifische Antigene, also um tumorassoziierte Komponenten, die in allen Melanomen vorkommen?



Abb. 3.2: Immundiffusionstest eines Antimelanomserums gegen Ultraschall- und Tritonextrakt aus Membranen von Tumoren und Normalgewebe

Das Antiserum ist im zentralen Stanzloch aufgetragen. Folgende Antigene wurden untersucht:

- | | | |
|------|--------------------|---------------------------|
| (1) | Ultraschallextrakt | von Melanommembranen |
| (2) | - " - | von Melanommembranen |
| (3) | - " - | von Erythrozytenmembranen |
| (4) | - " - | von Lymphozytenmembranen |
| (5) | - " - | von Melanomhomogenat |
| (6) | - " - | von Hauthomogenat |
| (7) | Tritonextrakt | von Melanomhomogenat |
| (8) | - " - | von Erythrozytenhomogenat |
| (9) | - " - | von Lymphozytenhomogenat |
| (10) | - " - | von Melanommembranen |
| (11) | - " - | von Erythrozytenmembranen |
| (12) | - " - | von Lymphozytenmembranen |

In letzterem Fall müßte das Antiserum gegen Membranextrakte anderer Melanome reagieren. Wie die weiteren Immundiffusionsteste zeigten, war dies für alle bisher getesteten Melanome

der Fall (Abb. 3.3). Die Präzipitationslinien gingen ineinander über. Es handelte sich somit um identische Antigene.

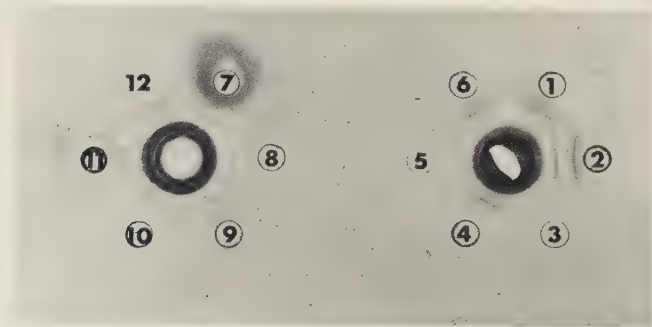


Abb. 3.3: Immundiffusionstest eines Antimelanomserums gegen Ultraschall- und Tritonextrakt von Membranen aus verschiedenen Melanomen

Das Antiserum ist im zentralen Stanzloch aufgetragen. Folgende Antigenpräparationen wurden untersucht:

- | | | |
|------|---------------------|------------------|
| (1) | Ultraschalleextrakt | von Melanom-1 |
| (2) | - " - | von Melanom-2 |
| (3) | - " - | von Lymphozyten |
| (4) | - " - | von Melanom-4 |
| (5) | - " - | von Erythrozyten |
| (6) | - " - | von Melanom-5 |
| (7) | Tritonextrakt | von Melanom-1 |
| (8) | - " - | von Melanom-2 |
| (9) | - " - | von Melanom-3 |
| (10) | - " - | von Melanom-4 |
| (11) | - " - | von Lymphozyten |
| (12) | - " - | von Melanom-5 |

Um die Spezifität des Immundiffusionstests zu steigern, wurde statt des kompletten Serums nur die Immunglobulinfraktion verwendet, die durch Ammonsulfat-Präzipitation erhalten werden konnte. Präzipitierende Antikörper fanden sich nur im Sediment der 45% Ammonsulfatsättigung; weder im Überstand noch in der Waschflüssigkeit waren reagierende Gammaglobuline nach-

weisbar (Abb. 3.4). Mit Hilfe der Ammonsulfatfraktionierung konnten die Immunglobuline 5fach angereichert werden und damit die Immundiffusion bezüglich der Antikörper 5mal empfindlicher gemacht werden. Für alle weiteren Tests wurde deshalb immer die Immunglobulinfraktion herangezogen.

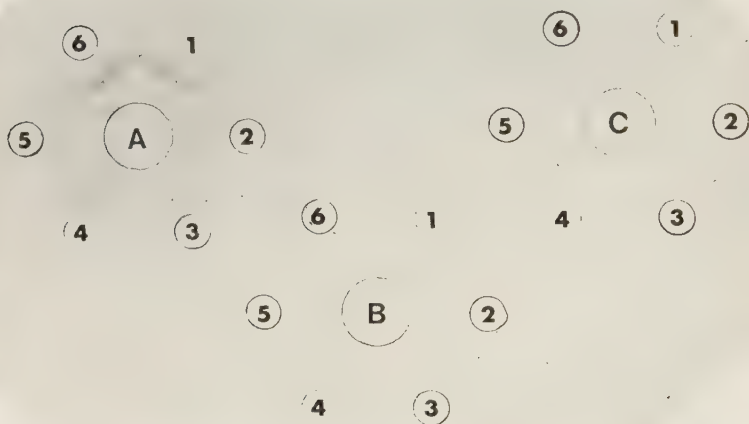


Abb. 3.4: Nachweis der Anreicherung präzipitierender Antikörper im Ammonsulfatpräzipitat

- (A): Immunglobulinfraktion (= 45% Ammonsulfatsättigung)
 (B): Überstand der 45% Ammonsulfatsättigung
 (C): Waschflüssigkeit des Ammonsulfatpräzipitates

- (1): Tritonextrakt des Melanoms-1
 (2): Tritonextrakt des Melanoms-2
 (3): Tritonextrakt normaler Lymphozyten
 (4): Tritonextrakt des Melanoms-3
 (5): Tritonextrakt eines humanen Glioms
 (6): Tritonextrakt des Melanoms-4

Die Immunglobulinfraktion enthält Antikörper gegen zwei verschiedene Antigene, die in allen 4 untersuchten Melanomen identisch sind.

Die nächste Frage betraf den nach Ultraschallbehandlung unlöslichen Membrananteil. Sind in diesem noch tumorassoziierte Komponenten vorhanden oder nicht? Zu diesem Zweck wurde der unlösliche Membrananteil mit dem nichtionischen Detergens Triton X-100 inkubiert und die dadurch herausgelösten Proteine gegen das Antiserum getestet. Zu erwähnen wäre noch, daß sich mit Triton etwa 50% der Tumormembranen in Lösung bringen lassen. Wurde der Triton-Extrakt mit dem adsorbierten Antiserum zur Reaktion gebracht, erhielt man 2 Präzipitationslinien. Dagegen konnten keine Linien mit Triton-Extrakten von Normalzellen wie Lymphozyten oder Erythrozyten erhalten werden.

Die Befunde sprechen dafür, daß auch der Triton-Extrakt zwei tumor-assoziierte Proteine enthält.

Um zu sehen, ob die im Schalleextrakt enthaltenen tumor-assoziierten Antigene mit denen im Tritonextrakt nachweisbaren verwandt oder identisch sind, wurden die Antiseren kreuzweise getestet. Wie der Immundiffusionstest zeigte, enthielten die beiden Extrakte je ein gemeinsames und ein unterscheidbares Antigen (3.5).

Zur elektrophoretischen Charakterisierung der tumor-assoziierten Komponenten fehlte das zu vergleichende Normalgewebe. Dieses Problem wurde deshalb auf indirektem Weg unter folgender Überlegung zu lösen versucht. Das Immunpräzipitat, das sich im Immundiffusionstest nachweisen läßt, besteht aus dem Antigen und dem Antikörper. Antikörper sind elektrophoretisch gut determiniert, da sie aus zwei Untereinheiten bestehen, der schweren Kette mit Molekulargewicht von 55.000 dalton und der leichten Kette mit Molekulargewicht von 33.000 dalton. Unter den Bedingungen der Polyacrylamidelektrophorese in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat werden reine Antikörper in ihre Untereinheiten zerlegt und ergeben 2 Banden in dem entsprechenden Molekulargewichtsbereich. Bei elektrophoretischer Auftrennung des Immunpräzipitates, also dem Antigen-

Antikörperkomplex, sollte man demnach die zwei Banden des Antikörpers sowie die Banden der Antigene finden. Zum Vergleich sollte man noch den ungebundenen Antikörper sowie das zu testende Antigen elektrophoretisch nebeneinander laufen lassen. Aus der Differenz der drei Elektrophoresemuster müßten sich die tumor-assoziierten Antigene identifizieren lassen.

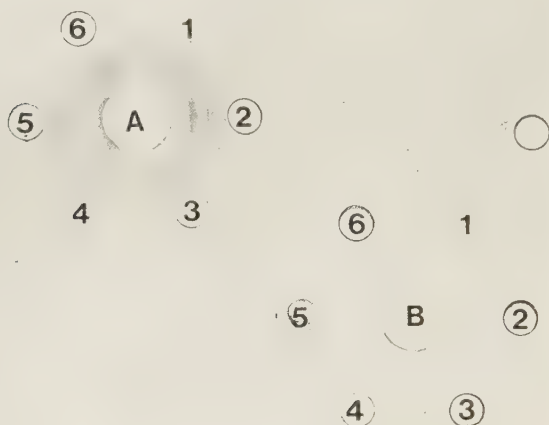


Abb. 3.5: Immundiffusionstest eines Antimelanomsersums gegen Ultraschall- und Tritonextrakt aus Membranen von Tumoren

Als Antiserum wurden verwendet:

(A) Immunglobulinfraktion

(B) Überstand des 45% Ammonsulfatpräzipitates des Serums

Als Antigene wurden untersucht:

(i) Tritonextrakt von Melanom-2

(ii) Ultraschallextrakt von Melanom-2

(iii) Tritonextrakt von Melanom-4

(iv) Tritonextrakt von Melanom-1

(v) Ultraschallextrakt von Gliom-4

(vi) Tritonextrakt von Melanom-5

Die elektrophoretische Analyse des Tritonextraktes nach Präzipitation mit dem adsorbierten Antimelanomserum ergab im wesentlichen 2 Befunde (Abb. 3.6):

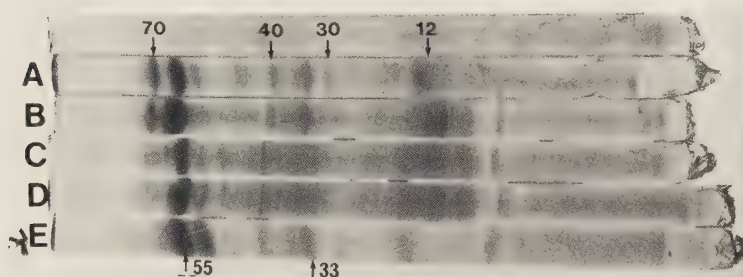


Abb. 3.6: Elektrophoresemuster des Tritonextraktes von Zellmembranen zweier maligner Melanome, eines dagegen gerichteten Antikörpers sowie des Immunpräzipitates.

- (A): Muster des Tritonextraktes von Melanom-1
- (B): Muster des Tritonextraktes von Melanom-2
- (C): Muster des Immunpräzipitates von Antikörper und Tritonextrakt des Melanoms-1
- (D): Muster des Immunpräzipitates von Antikörper und Tritonextrakt von Melanom-2
- (E): Muster des Antikörpers

Pfeile bezeichnen Banden, die nur im Antigen und im Immunpräzipitat erkennbar sind. Zahlen geben das Molekulargewicht der betreffenden Banden $\times 1000$ an.

1. Bei der Hauptbande des Tritonextraktes handelt es sich sehr wahrscheinlich nicht um eine tumor-assoziierte Komponente, weil sie mit dem Antikörper nicht präzipitiert werden konnte. Das Molekulargewicht des Proteins dieser Bande wurde auf Grund seiner elektrophoretischen Beweglichkeit auf 60.000 dalton geschätzt.
2. Tumor-assoziierte Banden scheinen sowohl im hochmolekularen Bereich bei etwa 70.000 dalton sowie im mittleren und

niedrigen Molekulargewichtsbereich anzutreffen zu sein. Bei genauer Analyse erkennt man mindestens 4 Banden, die sowohl in der Antigenpräparation wie auch im Immunkomplex vorhanden sind, die aber im Elektrophoresemuster des Antikörpers fehlen. Auf Grund ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit kann das Molekulargewicht dieser Proteine mit 70.000, 40.000, 30.000 und 12.000 dalton abgeschätzt werden (Abb. 3.6).

3.1.3. Nachweis der Tumorspezifität

Nach der elektrophoretischen Analyse ließen sich mit Hilfe des adsorbierten Antimelanomserums einzelne Proteinkomponenten aus dem als Antigen verwendeten Schallextrakt präzipitieren. Nachdem das Antiserum nur mit Tumorantigen reagierte und kein Immunpräzipitat mit Extrakten aus Normalzellen bildete, kann man annehmen, daß diese Komponenten tumorspezifisch sind. Genauer gesagt, könnte es sich hierbei um melanomspezifische Proteinkomponenten handeln. Es läßt sich jedoch nicht mit Sicherheit sagen, ob es sich um 4 individuelle Proteine handelte oder ob es sich um Untereinheiten eines oder zweier Proteine handelte, da unter den Bedingungen der Elektrophorese alle Proteine in ihre Untereinheiten zerlegt wurden. Nur Proteine mit einer einzigen Peptidkette wanderten in dieser Elektrophorese als eine einzelne Bande. Auf Grund der elektrophoretischen Analyse läßt sich nicht auf die Reinheit einer Proteinisolierung rückschließen.

Die Frage, die sich nach diesen Befunden aufdrängte, kann in der Weise formuliert werden: Sind die im Melanom nachgewiesenen Proteine nur melanomspezifische oder mehr generelle tumorspezifische Antigene? Mit anderen Worten, enthalten andere Tumoren gleiche oder nahe verwandte Membrankomponenten? Um diese Frage zu klären, wurde das adsorbierte Antimelanomserum auch gegen Schall- und Tritonextrakte anderer Tumoren getestet. Wenn diese Tumoren immunologisch identische Antigene produzieren, sollten diese mit dem Antiserum reagieren. Wie schon erwähnt, diente als Antikörper die Immunglobulinfraktion, die die Nachweisgrenze um den Faktor 5 erhöhte. Als Kontrolle wurde ein Schallextrakt von Erythrozyten und Lymphozyten sowie ein Tritonextrakt von Normalhirn- und Normalnierengewebe sowie von Lymphozyten gesunder Spender verwendet. Die Immunglobulinfraktion, die gegen den Tritonextrakt einer Melanommembranfraktion hergestellt worden war, reagierte mit dem Schall- und Tritonextrakt mehrerer Melanome sowie gegen die glei-

chen Extrakte von allen bisher aufgearbeiteten menschlichen Gliomen (Abb. 3.7). Daneben fand sich eine positive Kreuzreaktion mit dem Schallextrakt einer chronisch lymphatischen Leukämie und eines Nierenkarzinoms.

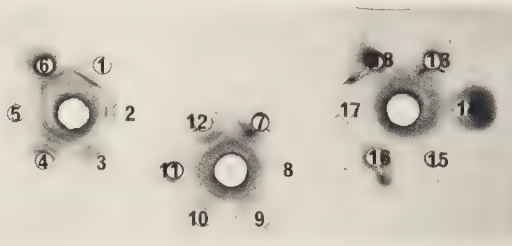


Abb. 3.7: Reaktion der Immunglobulinfraktion eines adsorbierten Antimelanomserums mit Antigenpräparationen verschiedener menschlicher Tumoren und Normalgewebe.

Als Antigene dienen:

- (1) Schallextrakt von Melanom-2
- (2) Tritonextrakt von Gliom-6
- (3) Tritonextrakt von Gliom-9
- (4) Schallextrakt von Gliom-4
- (5) Schallextrakt von chronisch lymphatischer Leukämie
- (6) Schallextrakt des Nierenkarzinoms-3
- (7) Tritonextrakt von Melanom-4 (Antigen gegen welches das Antiserum produziert wurde)
- (8) Tritonextrakt von Gliom-7
- (9) Tritonextrakt von Gliom-8
- (10) Tritonextrakt von Gliom-4
- (11) Tritonextrakt von Nierenkarzinom-1
- (12) Tritonextrakt von Melanom-5
- (13) Schallextrakt von Erythrozytenmembranen
- (14) Tritonextrakt von Normalhirnmembranen
- (15) Schallextrakt von Normalhirnmembranen
- (16) Schallextrakt von Lymphozytenmembranen
- (17) Schallextrakt von Lymphozytenmembranen
- (18) Schallextrakt von Normalniere

Die verwendete Immunglobulinpräparation enthielt Antikörper gegen ein oder mehrere Antigene im Melanom, Gliom, Nierenkarzinom und einer lymphatischen Leukämie. Keine Präzipita-

tionslinien wurden bei den Antigenen aus Normalgewebe gefunden, obwohl diese bis zu 16fach höher konzentriert getestet wurden. Das bedeutet, daß im Normalgewebe diese Komponenten, wenn überhaupt, in einer Konzentration von weniger als 5% von der in den Tumorzellen vorhanden sind.

Testete man die Antigene in verschiedenen Kombinationen nebeneinander, konnte man prüfen, ob sie identisch sind oder nicht. Im ersten Fall sollten die Präzipitationslinien bogenförmig ineinander überlaufen. Dies schien zumindest für ein bestimmtes Melanom-, Gliom- und Nierenkarzinomantigen der Fall zu sein (Abb. 3.8).

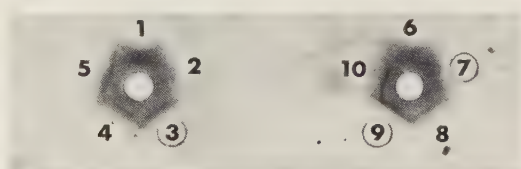


Abb. 3.8: Immunpräzipitation der Immunglobulinfraktion eines Antimelanomserums gegen Antigenpräparationen aus verschiedenen Tumoren.

- (1) Schalleextrakt von Melanom-2
- (2) Schalleextrakt von Gliom-4
- (3) Tritonextrakt von Melanom-5
- (4) Tritonextrakt von Gliom-8
- (5) Schalleextrakt von Melanom-4
- (6) Schalleextrakt von Melanom-2
- (7) Tritonextrakt von Melanom-5
- (8) Tritonextrakt von Gliom-7
- (9) Tritonextrakt von Melanom-1
- (10) Schalleextrakt von Nierenkarzinom-3

Mit Ausnahme des Schalleextraktes von Gliom-7 fand man bei allen anderen Antigenpräparationen Präzipitationslinien, die teilweise ineinander übergingen und damit auf identische Proteinkomponenten hinwiesen. Das traf vor allem für den

Schallextrakt von Melanom-2 und den Tritonextrakt von Melanom-4 zu, gegen die Antiseren hergestellt worden war sowie gegen die Tritonextrakte von Gliom-4 und Gliom-7. Die Nummer hinter den Tumoren bedeutet, daß diese von verschiedenen Patienten stammen. Der negative Befund des Schallextraktes von Gliom-7 dürfte auf einer zu geringen Antigenkonzentration beruhen. Nachdem jedoch eine Kreuzreaktion mit dem Tritonextrakt auftrat, war das betreffende Antigen auch im Gliom-7 nachweisbar.

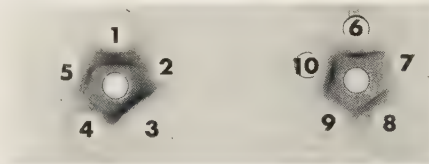


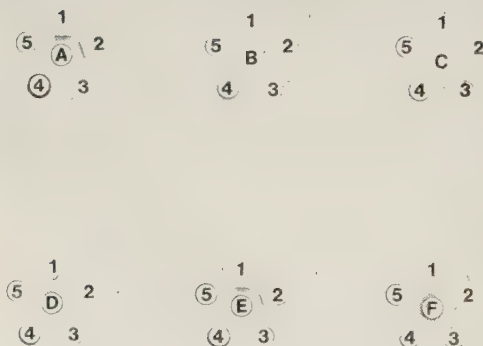
Abb. 3.9: Immunpräzipitation der Immunglobulinfraction eines Antimelanomserums gegen Antigenpräparationen aus verschiedenen Tumoren.

- (1) Schallextrakt von Melanom-2
- (2) Tritonextrakt von Gliom-3
- (3) Tritonextrakt von Melanom-4
- (4) Tritonextrakt von Gliom-4
- (5) Tritonextrakt von Gliom-7
- (6) Tritonextrakt von Melanom-1
- (7) Schallextrakt von Gliom-7
- (8) Tritonextrakt von Gliom-8
- (9) Tritonextrakt von Melanom-2
- (10) Tritonextrakt von Membranfraktion aus Melanom-1

3.1.4. Kreuzreaktion des Antimelanomserums mit Melanom-, Gliom- und Nierenkarzinomantigenen

Die Ergebnisse der Immundiffusion sprechen dafür, daß Melanome, Gliome und die bisher getesteten Nierenkarzinome gemeinsame tumorspezifische Antigene besitzen. Die Identität dieser Antigene ließe sich auf Grund der Tatsache beweisen, daß sie einen gegen sie gerichteten Antikörper zur Präzipitation bringen sollten. Mit anderen Worten, läßt man das Antimelanomserum mit dem Gliomantigen oder dem Nierenkarzinomantigen reagieren, so müßte sich der spezifische Antikörper ausfällen lassen, vorausgesetzt Melanomantigen und Gliom- bzw. Nierenkarzinomantigen sind identisch. Der Überstand des Immunpräzipitates sollte dann frei von dem Antikörper sein und keine Reaktion mehr mit dem Melanomantigen zeigen. Diese sogenannten Blockierungsversuche wurden mit der Immunglobulinfraction durchgeführt. Es gelang sowohl mit Gliomantigen wie mit Nierenkarzinomantigen, den gegen Melanomantigen produzierten Antikörper aus dem Antimelanomserum herauszufällen. Der Überstand dieser Fällung reagierte nicht mehr mit dem Melanomantigen (Abb. 3.10). Diese Ergebnisse machen es sehr wahrscheinlich, daß die im menschlichen Melanom, Gliom und Nierenkarzinom identifizierten tumorspezifischen Antigene immunologisch identisch sind. Diese Befunde ließen sich mit der empfindlicheren Methode der Gegenstromelektrophorese bestätigen.

Die bisher verwendeten und untersuchten Antigenpräparationen stammten alle von frischem Tumormaterial und nicht von in vitro gezüchteten Tumorzellen, die frei von bindegewebigen Verunreinigungen wären und demnach ein wesentlich besseres Ausgangsmaterial darstellen würden. Voraussetzung wäre jedoch, daß die in postoperativ zur Verfügung stehendem Tumorgewebe nachweisbaren tumorspezifischen Antigene auch von in vitro kultivierten Tumorzellen noch synthetisiert werden.



Abl. 3.10: Blockierungsexperiment des Antimelanomserums mit Antigenen aus verschiedenen Melanomen und anderen menschlichen Tumoren

Proben des zentralen Stanzloches:

- (A) Immunglobulinfraktion des Antimelanomserums (IgG-M2)
- (B) Überstand des Immunpräzipitates: IgG-M2 mit Melanom-2-AG
- (C) Überstand des Immunpräzipitates: IgG-M2 mit Melanom-5-AG
- (D) Überstand des Immunpräzipitates: IgG-M2 mit Nierenkarzinom-AG
- (E) Immunglobulinfraktion des Antimelanomserums (IgG-M2)
- (F) Überstand des Immunpräzipitates: IgG-M2 mit Gliom-4-AG

Proben der peripheren Stanzlöcher:

- (1) Antigen (Schallerextrakt) von Melanom-2 (= Melanom-2-AG)
- (2) Antigen (Tritonextrakt) von Melanom-5 (= Melanom-5-AG)
- (3) Antigen (Schallerextrakt) von Nierenkarzinom
- (4) Antigen (Tritonextrakt) von Gliom-4 (= Gliom-4-AG)
- (5) Antigen (Schallerextrakt) von Gliom-6 (= Gliom-6-AG)

3.1.5. Nachweis von tumorspezifischen Membranantigenen bei *in vitro* gezüchteten Melanomzellen

Voraussetzung für den Nachweis tumorspezifischer Membranantigene bei *in vitro* gezüchteten Melanomzellen wäre außerdem die erfolgreiche Etablierung einer permanenten Zelllinie und die kontinuierliche Tumorzellproduktion. Nach ausgedehnten Studien unter Variation mehrerer Parameter wie Serumkonzentration, essentielle Zusätze von Aminosäuren und Coenzymen ist es gelungen, von 3 Primärtumoren und einer Hirnmetastase menschlicher Melanome Kulturen zu etablieren. Im Reagensglas zeigten die Melanomzellen mehr epitheloide Form und neigten zu starker Assoziation untereinander (Abb. 3.11).

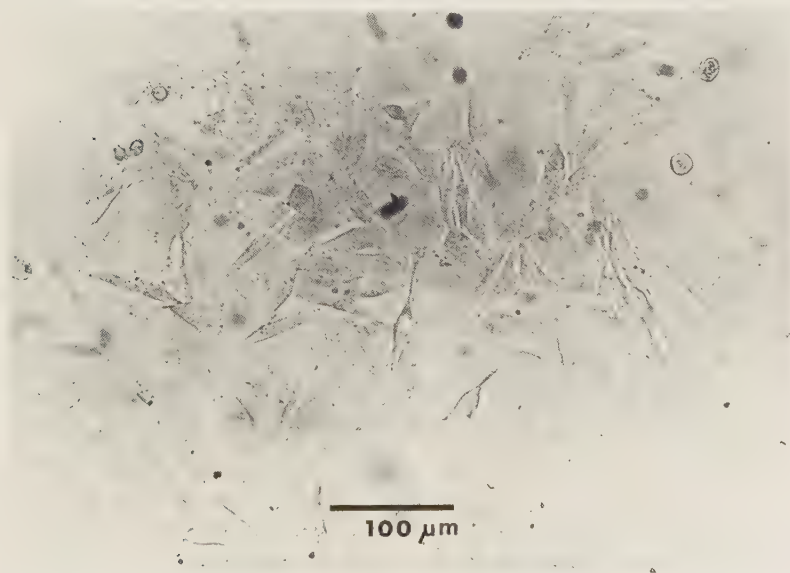


Abb. 3.11: Lichtmikroskopische Aufnahme *in vitro* gezüchteter Zellen einer Hirnmetastase eines malignen Melanoms.

Die Zellen wachsen mehrschichtig, zeigen prominente Nukleoli sowie einige Mitosen und sind sehr stark aneinander assoziiert. Die Zellteilungsrate beträgt 12 bis 14 Stunden und entspricht einem relativ hohen Wachstumspotential.

Die prominenten Nukleoli und die häufigen Mitosefiguren deuteten auf eine besonders hohe Proliferationstendenz hin. Sie spiegelte sich in der Verdoppelungszeit der Zellen von 12 bis 14 Stunden wider. Die dunklen Punkte im Zytoplasma dürften die pigmenthaltigen Melaningranula sein. Die ultrastrukturelle Analyse der *in vitro* gezüchteten Melanomzellen bestätigten diesen Verdacht. Die Zellen bildeten demnach auch *in vitro* Melanosomen und Prämelanosomen aus, allerdings war der Gehalt pro Zelle deutlich geringer als der im Tumorbiopsiematerial (Abb. 3.12). Nichtsdestotrotz konnte die Melaninproduktion als guter Marker benutzt werden, um die Melanomzellen als solche zu identifizieren. Versuche, normale Melanozyten als Kontrollzellen in Kultur zur Proliferation zu bringen, waren erfolglos. Es gelang zwar Melanozyten der Choroidea des menschlichen Auges über mehrere Tage in Kultur am Leben zu erhalten, ihre produktive Vermehrung konnte jedoch nie beobachtet werden.

Ein weiteres nicht unwichtiges Charakteristikum maligner Zellen in Kultur ist ihr mehrschichtiges Wachstum, das bei normalen nicht-transformierten Zellen nie beobachtet wird. Auch wachsen nur die Tumorzellen auf Agargelen, so daß man sie von normalen Zellen dadurch herausselektionieren kann. Auf diese Weise lassen sich eventuell milauswachsende Fibroblasten von den Tumorzellen entfernen.

Die Melanomzellen wurden solange subkultiviert, bis genügend Ausgangsmaterial für die Gewinnung von Membranproteinen zur Verfügung stand. Für die elektrophoretische und immunologische Analyse waren dazu etwa 10 mg erforderlich, die man aus 5 g Zellen (Feuchtgewicht) gewinnen konnte. Diese Menge an Zellen entsprach einer Wachstumsfläche von circa 10.000 cm^2 , also etwa 120 Plastikzuchtgefäßen mit 75 cm^2 Wachstumsfläche. Zur Gewinnung der Membranproteinen wurden die Zellen nach mechanischer Ablösung gewaschen und anschließend mit dem nichtionischen Detergens Triton-X-100 inkubiert.

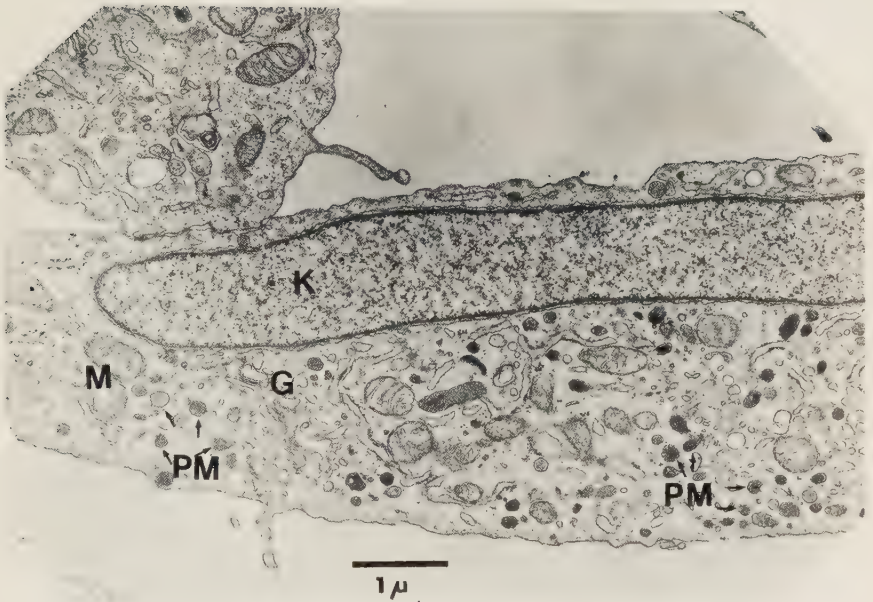


Abb. 3.12: Elektronenmikroskopische Aufnahme von in vitro gezüchteten Melanomzellen

Das Bild zeigt einen Ausschnitt von zwei Zellen, die an einer Stelle sehr engen Kontakt miteinander haben. Bei beiden ist die Zellmembran-soweit zu sehen ist-intakt. Auffallend der langgestreckte Kern (K) der einen Zelle. Neben den üblich vorhandenen subzellulären Kompartimenten wie Mitochondrien (M), Golgi-Apparat (G) finden sich Bläschen mit sehr elektronendichtem Inhalt, der eine körnige Struktur erkennen läßt. Es sind Melanosomen bzw. Prämelanosomen (PM), Organellen, die die Zelle eindeutig als Melanomzelle identifizieren.

Es konnte festgestellt werden, daß nach 15minütiger Inkubation bei 4°C nur etwa 5% des Gesamtproteins in Lösung ging, wogegen bei 30minütiger Inkubation bei 20°C etwa 15% Protein löslich war. Die Zusammensetzung dieser Tritonextrakte unter-

schied sich deutlich voneinander. Der bei 4°C hergestellte Extrakt enthielt viel weniger Proteinkomponenten als der bei 20°C gewonnene (Abb. 3.13 A, C, D).

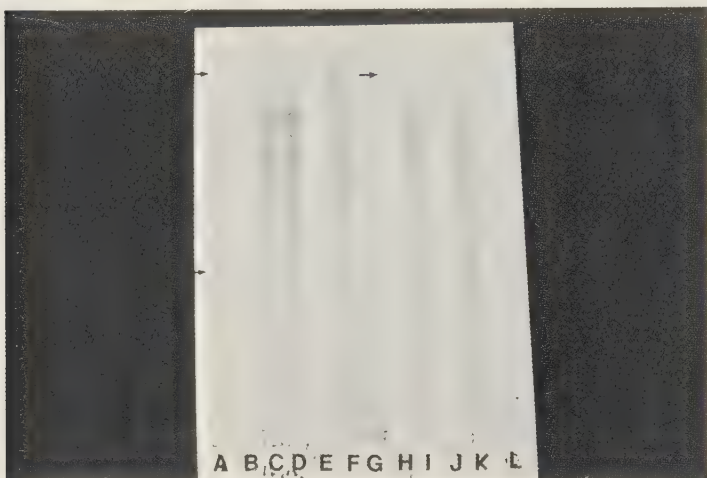


Abb. 3.13: Elektrophoresemuster löslicher Membranproteine und Glykoproteine aus *in vitro* gezüchteten Melanomzellen.

- (A) 1. Tritonextrakt (15 Minuten bei 4°C)
- (B) Glykoproteinfärbung des 1. Tritonextraktes
- (C) 2. Tritonextrakt (30 Minuten bei 20°C, Proteinausfällung mit 10% Trichloressigsäure)
- (D) 2. Tritonextrakt (Proteinausfällung mit kaltem 96%igen Äthanol)
- (E) Glykoproteinfärbung des 2. Tritonextraktes
- (F) Schalleextrakt nach Ausfällung mit 10% Trichloressigsäure
- (G) Schalleextrakt nach Ausfällung mit 96% Äthanol
- (H) Glykoproteinfärbung des Schalleextraktes
- (I) Unlöslicher Membranrückstand (Ausfällung mit 10% Trichloressigsäure)
- (J) Glykoproteinfärbung des unlöslichen Membranrückstandes
- (K) Unlöslicher Membranrückstand (Ausfällung mit 96% Äthanol)
- (L) Glykoproteinfärbung des unlöslichen Membranrückstandes

Pfeile zeigen an, wo Glykoproteinbanden auftreten. Nachdem für Glykoproteine die Molekulargewichtsabschätzung in Polyacrylamidgelen nicht adäquat ist, wird der Bereich auch nicht angegeben.

Der erstere enthielt 4 Hauptbanden und 4 schwächere Banden, die alle im Molekulargewichtsbereich von 70.000 bis 45.000 dalton lagen. Der bei 20°C gewonnene Tritonextrakt zeigte mindestens 10 besonders prominente Banden, dazu noch etwa 10 bis 12 weniger intensive, die sich alle über den ganzen Gelbereich verteilten, also Proteine aller Molekulargewichtsbereiche enthielten. Allein auf Grund des Elektrophoresemuster ließen sich die beiden Membranextrakte der Melanomzellen gut unterscheiden.

Zur Kontrolle wurde auch der Schalleextrakt und der unlösliche Anteil miteinander verglichen (Abb. 3.13 F,G und I,K). Beide unterschieden sich deutlich voneinander und auch von den beiden Tritonextrakten. Der Glykoproteinnachweis mit Hilfe des Perjodat-Schiffsschen Reagens ließ sich nur für den 1. Tritonextrakt sowie für den Schalleextrakt erbringen (Abb. 3.13 B,E,H,J,L). Nur im Muster dieser beiden Fraktionen konnten Glykoproteinkomponenten nachgewiesen werden. Die verschiedenen Extrakte der in vitro gezüchteten Melanomzellen wurden mit dem Antimelanomserum getestet. Die Frage war: Läßt sich ein kreuzreagierendes Antigen nachweisen? Bei positiver Antwort folgerte sich daraus die nächste Frage: In welchem Zellextrakt ist dieses Antigen vorhanden? Die umfangreichen Untersuchungen lassen sich folgendermaßen zusammenfassen: In den in vitro gezüchteten Melanomzellen wird eine Proteinkomponente gebildet, die mit dem Antiserum reagiert, das gegen frische Tumorzelleextrakte hergestellt worden ist. Es findet sich ausschließlich im 1. Tritonextrakt (Abb. 3.14). Der 2. Tritonextrakt, der durch längere Einwirkungsdauer bei höherer Temperatur gewonnen wurde, war selbst bei fünffach höherer Proteinkonzentration negativ. Ebenso zeigte der Schalleextrakt und der nach Beschallen und Tritonextraktion zurückbleibende unlösliche Membrananteil der Zellen keine Reaktion mit dem Antiserum.

Daraus kann man schließen, daß man mit einer relativ kurzzeitigen Inkubation bei 4°C den größten Teil des tumorspezifischen Membranantigens aus der Zellmembran herauslösen kann. Das macht es wahrscheinlich, daß das betreffende Antigen an der Außenseite der Zellmembran sitzt und deshalb relativ leicht auch für die tumorspezifischen Antikörper zugänglich ist.



Abb. 3.14: Immundiffusionstest eines Antimelanomserums gegen Extrakte aus *in vitro* gezüchteten Melanomzellen

Das Antiserum ist im zentralen Stanzloch aufgetragen. Folgende Antigenpräparationen wurden untersucht:

- (1) Tritonextrakt von Membranen aus Melanomgewebe
- (2) - " - von Melanomzelllinie-1
- (3) - " - von humanen Fibroblasten
- (4) - " - von Hühnerfibroblasten
- (5) - " - von Lymphozyten
- (6) " - " - von Melanomzelllinie-2
- (7) PBS-Extrakt-1 von Melanomzelllinie-1
- (8) PBS-Extrakt-2 von Melanomzelllinie-1
- (9) Tritonextrakt-1 von Melanomzelllinie-1
- (10) Tritonextrakt-2 von Melanomzelllinie-1
- (11) Unlöslicher Membranrest von Melanomzelllinie-1
- (12) SDS-Extrakt von Melanomzelllinie-1

" PBS entspricht Phosphat-gepufferter physiologischer Kochsalzlösung, pH = 7.2

Diese Schlußfolgerung konnte mit Hilfe der Immunfluoreszenz bestätigt werden. Ein gegen dieses Antigen in Kaninchen produziertes Antiserum zeigte nach ausreichender Absorption gegen Proteine aus Normalmembranen eine spezifische Fluoreszenz an in vitro gezüchteten Melanomzellen (Abb. 3.15).

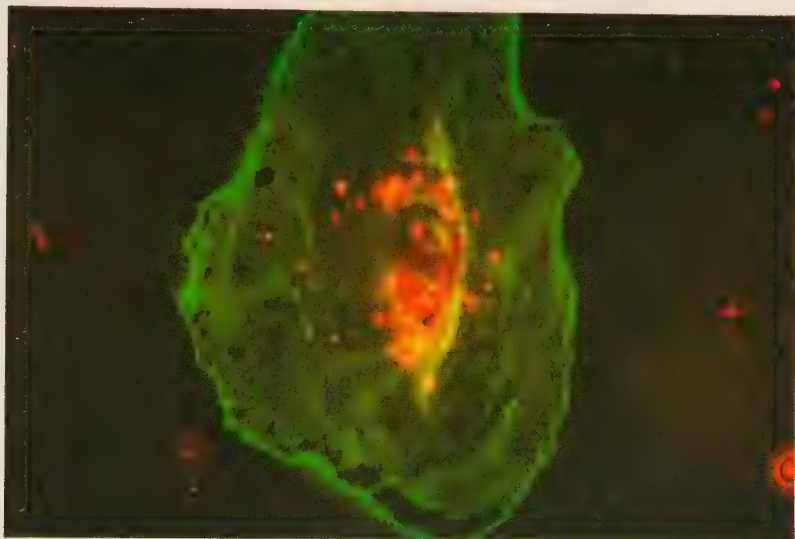


Abb. 3.15: Markierung eines tumorspezifischen Zellmembranantigens bei menschlichen Melanomzellen mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz

Als Antiserum diente gegen Melanommembranantigen produziertes Kaninchenserum, das ausreichend gegen Normalmembranproteine absorbiert wurde. Als Fluoreszenzmarker wurde ein Antikaninchen-Ziegen Serum verwendet. Die grüne Fluoreszenz ist ausschließlich an der Membran lokalisiert. Intrazelluläre Strukturen wie Kerne, Nukleoli oder Mitochondrien sind nicht markiert, konnten aber durch Gegenfärbung mit Rhodamin dargestellt werden.

Die Ergebnisse dieser indirekten Immunfluoreszenztechnik sprechen dafür, daß

1. das betreffende Antigen auch von kultivierten Zellen noch produziert wird und
2. an der Zellmembran der Tumorzellen lokalisiert ist.

3.2. Untersuchungen an Gliomen

3.2.1. Isolierung und Charakterisierung von Zellmembranen

Nach Homogenisation in isotoner Pufferlösung, differenzieller Zentrifugation und Auftrennung über einen Saccharosegradienten konnte eine subzelluläre Fraktion erhalten werden, die hauptsächlich aus Membranen bestand (Abb. 3.16).

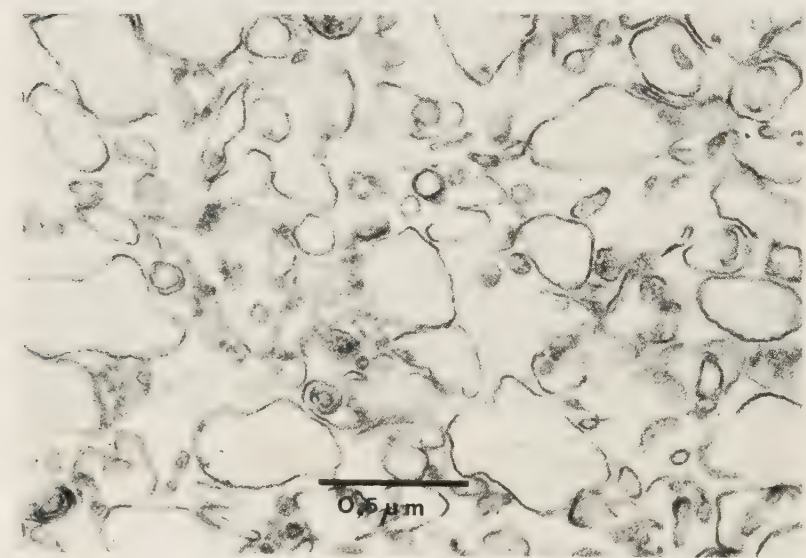


Abb. 3.16: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Zellmembranfraktion aus menschlichen Gliomen.

Man kann Membranen und Vesikel erkennen, die durch auffallende Größenunterschiede gekennzeichnet sind. Diese Unterschiede dürften artifiziell durch die Reaggregation von Membranbruchstücken zu Vesikeln während der Präparation verursacht worden sein. Die graufleckigen Bezirke sind durch tangential angeschnittene Membranflächen bedingt und stellen keine Verunreinigung dar. Elektronendichtes Material wie Kernfragmente oder Ribosomen konnten in diesen Membranen nicht beobachtet werden.

Die Ultrastruktur dieser Präparation zeigte Bläschen verschiedener Größe, die sehr wahrscheinlich durch Reaggregation von Membranfetzen entstanden sind. Verunreinigungen durch andere subzelluläre Teilchen wie Kerne, Mitochondrien, Mikrosomen oder rauhes endoplasmatisches Retikulum konnten nicht entdeckt werden.

Ein Vergleich mit analogen Präparation aus normalem menschlichen Hirngewebe offenbarte, daß letztere einen wesentlich höheren Myelingegehalt besaßen. Bemerkbar machte sich dies schon bei der Gradientensedimentation, bei der bei den Normalhirnpräparationen eine dicke weiße fettige Schicht auf der Oberfläche des Gradienten flotierte. Diese Schicht fehlte bei der Gliompräparation völlig. Das für Myelin typische basische Protein war in dieser Schicht besonders stark angereichert.

Auf Grund der ultrastrukturellen Analyse sedimentierte die reinste Zellmembranfraktion bei einer Dichte von 1.159 g/cm^3 . Fraktionen, die bei höherer Dichte angetroffen wurden, waren zunehmend von Mitochondrien und Ribosomen kontaminiert. Die Fraktion der Dichte 1.159 enthielt die höchste Aktivität an Natrium-Kalium-abhängiger ATPase sowie dem gliaspezifischen Enzym, der 2'-3' Nukleotidase.

3.2.2. Identifizierung tumorassoziierter Komponenten

Die auf diese Weise gewonnenen Zellmembranen menschlicher Gliome wurden nach Delipidieren und Desaggregation mittels Natrium-Dodecylsulfat elektrophoretisch analysiert und mit entsprechenden Präparationen aus normalem menschlichen Hirn verglichen. Unter den denaturierenden Bedingungen der dabei angewandten Elektrophorese ließ sich die Membranpräparation in mehr als 22 Banden auftrennen (Abb. 3.17).

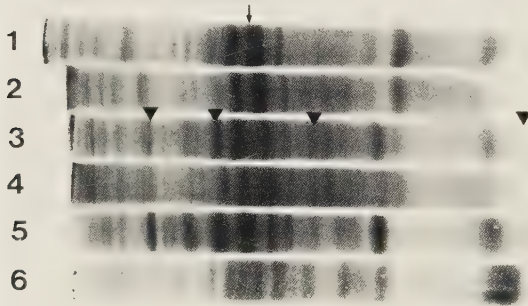


Abb. 3.17: Elektrophoresemuster von Zellmembranen aus menschlichen Gliomen und Normalhirn

Folgende Proben wurden elektrophoretisch analysiert:

- (1) Membranen von Normalhirn
- (2) Ultraschall-unlösliche Membranproteine von Normalhirn
- (3) Membranen von Gliomen
- (4) Ultraschall-unlösliche Membranproteine von Gliomen
- (5) Ultraschall-lösliche Membranproteine von Gliomen
- (6) Ultraschall-lösliche Membranproteine von Normalhirn

Im Muster der Gliommembranen lassen sich 4 Banden identifizieren (dicke kurze Pfeile), die im Muster der Normalhirnmembranen fehlen. Dagegen tritt bei letzteren eine Bande auf (dünner Pfeil), die im Muster der Gliommembranen fehlt.

Die Vielzahl der Banden spiegelte den komplexen Aufbau des Plasmalemm wider. Verglich man das Muster von Tumor- und Normalhirnmembranen miteinander, so erschien es auf den ersten Blick weitgehend identisch. Bei genauerer Analyse fand man einige zusätzliche Banden im Muster der Tumor- aber auch der Normalhirnmembranen. (Der Deutlichkeit wegen sind die im Tumormuster zusätzliche Banden mit Pfeilen angezeichnet; Abb. 3.17: Gel 3: 1, 2, 3 und 4).

Wie zu erwarten, fanden sich nach Densitometrie der angefärbten Gele qualitativ wie quantitativ weitgehend ähnliche Kurven. Vor allem die Hauptbanden waren von gleicher Intensität. Indirekt läßt sich daraus schließen, daß die Grundstruktur und die Hauptkomponenten bei Tumor- und Normalhirnmembranen gleich sind (Abb. 3.18). Unterschiede fanden sich im Bereich niedriger elektrophoretischer Mobilität, die auf ein relativ hohes Molekulargewicht rückschließen läßt, sowie im Bereich hoher elektrophoretischer Mobilität, die einem niedrigen Molekulargewicht entspricht. Die im Tumormuster zusätzlich nachweisbaren Proteinbanden haben ein abgeschätztes Molekulargewicht von 70.000 dalton, 55.000 dalton, 30.000 dalton und 10.000 dalton.

Um diese zusätzlichen Proteine näher charakterisieren zu können, war es notwendig, diese aus der Membran zu extrahieren und damit in lösliche Form zu bringen, denn ein membrangebundenes Protein ist für molekularbiologisch-biochemische wie für immunologische Untersuchungen ungeeignet.

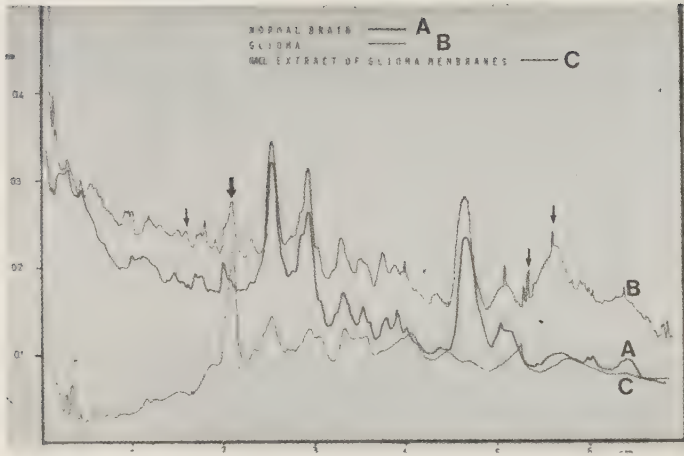


Abb. 3.18: Densitometrische Aufzeichnung der mit Coomassie-Blau angefärbten Gele von Zellmembranen aus Gliomen (blaue Kurve B) und aus Normalhirn (rote Kurve A).

Die Muster der Tumormembranen unterscheiden sich kaum von denen aus Normalhirn. Man findet qualitativ wie quantitativ fast identische Banden. (Die Kurven sind der Übersicht halber etwas untereinander gezeichnet.) Die Intensität der Hauptbanden ist identisch. Im Tumormuster finden sich 4 Banden (durch Pfeile gekennzeichnet), die im Muster der Normalhirnmembran nicht nachgewiesen werden können. Zwei von diesen zeigen eine niedrige elektrophoretische Mobilität entsprechend einem hohen Molekulargewicht, zwei haben ein relativ niedriges Molekulargewicht. Die grüne Kurve gibt das Muster des Schallextraktes von Membranen aus Gliomen wieder. Auffallend ist, daß vor allem eine der tumorassoziierten Proteinkomponenten präferentiell in Lösung geht (stärkerer Pfeil).

Die meisten in der Literatur beschriebenen Verfahren zur Gewinnung löslicher Extrakte aus Tumorzellmembranen verwendeten 3 M KCl, wobei die schwach desintegrierende Wirkung hochkonzentrierter Salzlösungen auszunützen versucht wurde. Damit ließen sich in der Tat eine Reihe von Proteinen aus der Membran von Gliomen herauslösen. Wie das Elektrophoresemuster zeigte, wurden fast ausschließlich jene Proteine aus der Membran herausgelöst, die auch in den Membranen von Normalhirn vorkommen (Abb. 3.19).

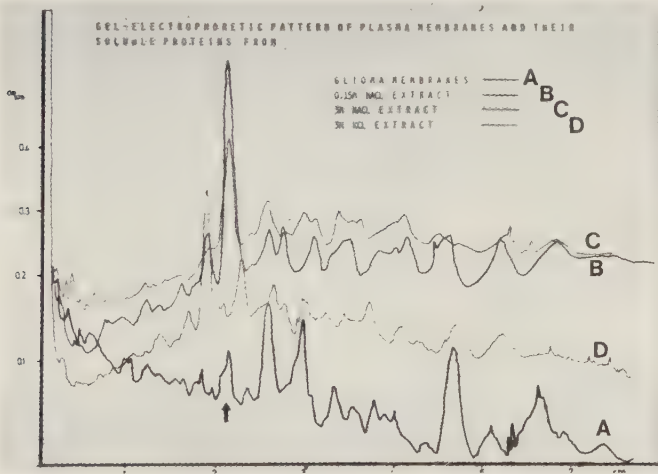


Abb. 3.19: Densitogramme der Elektrophoresemuster von Gliommembranen (A), dem 0.15 M NaCl-Schalleextrakt (B), dem 3 M NaCl-Extrakt (C) und dem 3 M KCl-Extrakt (D).

Die nur in den Tumormembranen vorkommenden Proteine wurden nur zum Teil solubilisiert und unter diesen Bedingungen nicht angereichert. Auffallend war der Unterschied in der Protein-

zusammensetzung jedoch, wenn man statt 3M KCl 3M NaCl verwendete. Unter diesen Bedingungen wurde ein Protein präferenziell herausgelöst, das nur in den Tumormembranen nachzuweisen war (Abb. 3.19, Kurve C). Diese Bande war im 3M KCl-Extrakt nur in sehr geringer Konzentration vorhanden. Quantitativ noch stärker ging diese Bande durch Beschallen in 0,15M NaCl in Lösung. Dieser Schallextrakt war qualitativ dem 3M NaCl-Extrakt weitgehend ähnlich. Nachdem die tumorassoziierte Bande aber stärker herausgelöst wurde und die Salzkonzentration, die elektrophoretische und immunologische Untersuchungen beeinträchtigte, nur ein Zwanzigstel betrug, wurde bei allen Schallextrakten als Lösungsmittel physiologische NaCl (0.15M) Lösung verwendet.

Aus den Elektrophoresemustern ließ sich weiters ableiten, daß die tumorassoziierte Proteinkomponente (Abb. 3.19, Pfeil) durch Beschallen in 0.15M NaCl-Lösung um den Faktor 5 angereichert werden konnte. Bemerkenswert wäre noch, daß unter diesen Bedingungen auf Proteimbasis bezogen 20% der Tumormembranen, aber nur 5% der Normalhirnmembranen in Lösung gebracht werden konnten. Dieses unterschiedliche Lösungsverhalten deutete auf eine labilere Struktur der Tumorzellmembranen hin, die möglicherweise durch einen Lipidmantel verursacht sein könnte.

Der Großteil der Membranproteine (80% bzw. 95%) war durch Beschallen nicht in Lösung zu bringen. Dagegen gelang es mit dem nichtionischen Detergens Triton-X-100 bis zu 50% der Membranproteine zu solubilisieren. Dadurch wurden alle Komponenten mehr oder weniger gleichmäßig herausgelöst. Eine selektive Solubilisierung war auch durch Variation der Bedingungen nicht möglich.

Der Triton-unlösliche Membrananteil konnte jedoch durch aggressivere, also stärker desaggregierende Detergentien wie Natrium-Dodecylsulfat zum Teil in Lösung gebracht werden. Mit diesem Detergens konnte etwa ein Fünftel des Triton-unlöslichen Anteils extrahiert werden. Durch Verwendung von

Mercaptoäthanol als Spaltnittel von S-S - Brücken in Proteinen gelang eine weitere Desintegration. Eine völlige Solubilisierung konnte jedoch auch mit dem stärksten wässrigen Lösungsmittel nicht erreicht werden. Nur unter Zuhilfenahme von organischen Lösungsmitteln wie Phenol-Eisessig waren Membran ohne vorherige Delipidierung völlig in Lösung zu bringen.

Die Verwendung von Detergentien hat den Vorteil, daß Membranproteine wesentlich besser in Lösung gehen als ohne Detergentien. Der Nachteil liegt darin, daß sie nur schwer eliminiert werden können und viele enzymatische und biochemische Reaktionen stören. Die erfolgreiche Entfernung des Detergens aus einer Membranproteinlösung bringt jedoch ein weiteres Problem mit sich, das der Reaggregation zu neuen partikulären Strukturen. Reaktionen, die nur in löslicher Phase ablaufen, werden dadurch gestört. Für viele biochemische und immunologische Tests ist die Präsenz eines Detergens unerlässlich. Vor allem die Immunpräzipitation von Antigen und Antikörper kann nur dann als spezifisch gelten, wenn ausschließlich lösliche Proteine verwendet werden.

Es war daher von großer Bedeutung zu klären, ob und inwieweit Detergentien die Immunpräzipitationsreaktion stören. Zu diesem Zweck wurde der Einfluß der 2 gebräuchlichsten ionischen und nichtionischen Detergentien geprüft. Die nichtionischen Detergentien Triton-X-100 und Nonidet-P 40 sowie die ionischen Detergentien Natriumdesoxycholat und Natriumdodecylsulfat wurden in steigender Konzentration sowohl dem Antigen und dem Antiserum wie auch dem Agarosegel zugesetzt. Es zeigte sich, daß die nichtionischen Detergentien selbst bei einer Konzentration von 1% im Agarosegel die Immunpräzipitation nicht beeinflussten (Abb. 3.20, A und B). Die ionischen Detergentien dagegen störten die Präzipitation zunehmend mit steigender Konzentration. Bei Dodecylsulfat führte eine 1%ige Lösung im Gel zu einem völligen Ausbleiben der Präzipitation (Abb. 3.20, C und D).

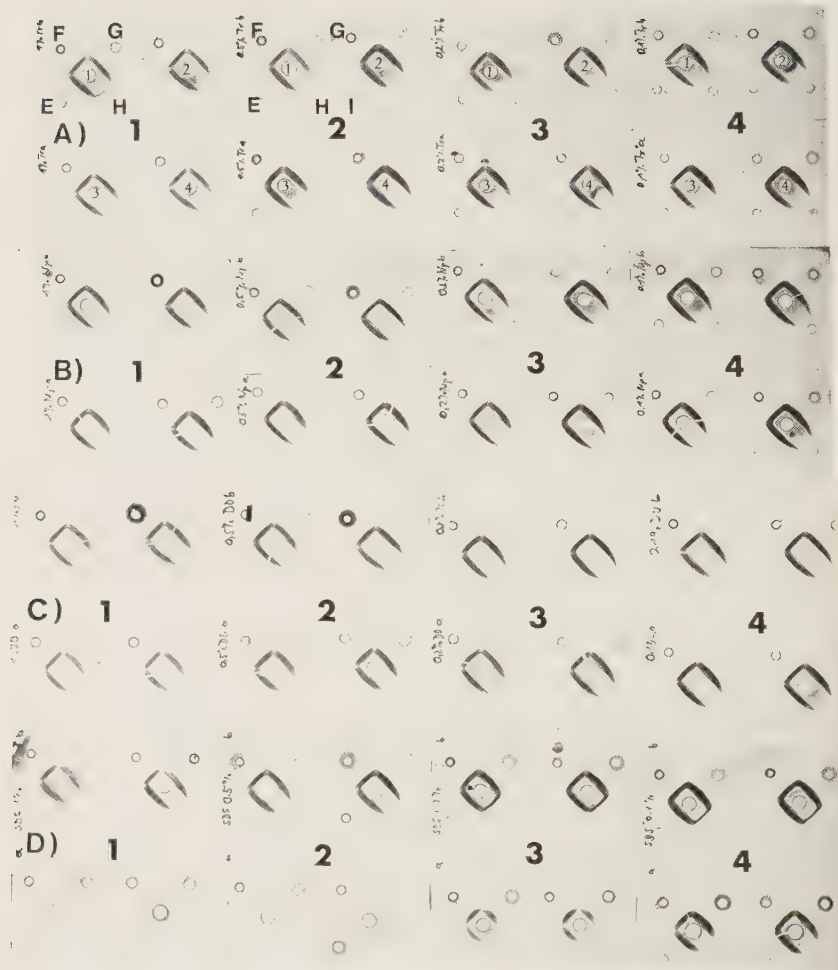


Abb. 3.20: Effekt von ionischen und nichtionischen Detergentien auf die Immunpräzipitation in Agarosegelen

- A: Nichtionisches Detergens Triton-X-100 (absteigende Konzentration im Gel von links nach rechts, 1%-0.5%-0.2%-0.1%)
 1, 2, 3 und 4: steigende Tritonkonzentration im Antiserum
 E, F, G und H: steigende Tritonkonzentration im Antigen
- B: Nichtionisches Detergens Nonidet-P 40, sonst analog wie A
- C: Ionisches Detergens Natrium-Desoxycholat, sonst analog wie A
- D: Ionisches Detergens Natrium-Dodecylsulfat, sonst analog wie A
- Als Antigen diente Humanalbumin, als Antiserum Kaninchen-Anti-Humanalbumin.

Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, daß nicht-ionische Detergentien bestimmte serologische und immunologische Techniken nicht beeinflussen, wogegen bei Verwendung von ionischen Detergentien große Vorsicht bei der Interpretation der Ergebnisse geboten ist.

Mit der Verwendungsmöglichkeit des nichtionischen Detergens Triton-X-100 war jedoch eine der wesentlichen Voraussetzungen zur immunologischen Charakterisierung unlöslicher Membranproteine gegeben.

3.2.3. Nachweis der Tumorspezifität

Bei den in Gliommembranen zusätzlich auftretenden Proteinkomponenten lag es nahe, den Nachweis der Tumorspezifität auf immunologischem Wege zu erbringen. Dazu wurde gegen den Schallextrakt, der die tumorassoziierten Proteine angereichert enthielt, ein Antiserum in Kaninchen produziert. Nach ausreichender Adsorption gegen zahlreiche Normalproteine wie Humanserum, Membranextrakt aus menschlichen Erythrozyten, Lymphozyten und Normalhirn wurde das Antiserum auf seine Spezifität getestet. Im Immundiffusionstest reagierte dieses Serum mit dem Schallextrakt und dem Tritonextrakt von Membranen aus einer Reihe menschlicher Gliome; nicht dagegen mit jenen aus Normalhirn (Abb. 3.21).

Das Antigliomserum reagierte nicht nur gegen den Schallextrakt, gegen den es produziert wurde, sondern auch mit analogen Präparationen aus einer Reihe anderer menschlicher Gliome (Abb. 3.21: A-1, A-3, A-5, A-8, A-9, A-10). Die Ouchterlonytests zeigten, daß die Antigene mit denen das Serum reagierte, identisch waren, da die Banden ineinander übergingen und weder kreuzten noch Spornbildung zeigten. Dieses Antiserum reagierte nicht mit analogen Präparationen aus normalem menschlichen Hirn und ebenso nicht mit einem Gemisch von Seren verschiedener Blutgruppen. Selbst bei zwanzigfach höherer Proteinkonzentration war keine Präzipitationsreaktion zu erkennen. Mit der wesentlich empfindlicheren Methode der Gegenstromelektrophorese wurde ebenfalls keine Immunreaktion nachgewiesen. Daraus ließ sich schließen, daß es sich bei der aus Tumormembranen isolierten Komponente um ein tumorassoziiertes Antigen handelte.

Mit noch empfindlicheren Methoden müßte es möglich sein, definitiv nachzuweisen, ob die tumorassoziierte Membrankomponente in Membranen normaler Gliazellen vorhanden ist oder nicht. Eine Möglichkeit dafür wäre die indirekte Immunfluoreszenz, die je nach verwendeter Modalität und Reinigung des

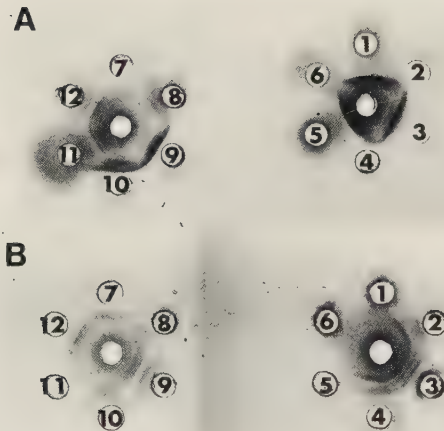


Abb. 3.21: Immundiffusionstest eines Antigliomserums gegen Antigenpräparationen von Gliomen und Normalhirn

- A-1, A-3, A-5: Schallextrakt von Membranen menschlicher Gliome
A-2, A-4, A-6: Schallextrakt von Membranen aus Normalhirn
A-7, A-12: Unlöslicher Membrananteil von Gliomen
A-8, A-9, A-10: Schallextrakt von Membranen anderer Gliome
A-11: Schallextrakt von Membranen aus anderen Normalhirnen
B-1, B-5: Schallextrakt von Membranen aus Normalhirn
B-6: Unlöslicher Membrananteil von Normalhirn
B-2, B-4: Schallextrakt von Membranen eines weiteren Glioms
B-3: Unlöslicher Membrananteil von selbigem Gliom
B-8, B-10: Schallextrakt von Membranen eines weiteren Glioms
B-9: Unlöslicher Membrananteil von selbigem Gliom
B-7, B-12: Schallextrakt von Membranen eines weiteren Glioms
B-11: Unlöslicher Membrananteil des selbigen Glioms

Im zentralen Stanzloch wurde ein Antiserum gegen den Schallextrakt von Membran von Gliomen, entsprechend der Probe A-1 aufgetragen.

Antikörpers 50- bis 100mal sensitiver ist als die Gegenstromelektrophorese. Dazu müßten zwei Bedingungen erfüllt werden:

1. Gliomzellen und ihre entsprechenden Normalzellen müßten *in vitro* zumindestens einige Zeit gezüchtet werden können.
2. Die gezüchteten Tumorzellen müßten die nachzuweisende Membrankomponente auch *in vitro* noch synthetisieren.

Um diese 2 Prämissen des Immunfluoreszenzexperimentes zu erfüllen, wurden von menschlichen Glioblastomen und Normalhirn Primärkulturen angelegt. Danach wurde versucht, die tumorassoziierte Membrankomponente immunologisch nachzuweisen.

3.2.4. Nachweis tumorassoziierter Membranantigene bei in vitro gezüchteten Gliomzellen

Von allen postoperativ erhaltenen Proben menschlicher Gliome wurden Primärkulturen angelegt. In etwa 60% der Fälle begannen die Tumorzellen nach Anhaften an der Gefäßwand mit einer Proliferation. Meist wuchsen die Zellen von einem Herd aus und proliferierten sternförmig (Abb. 3.22).

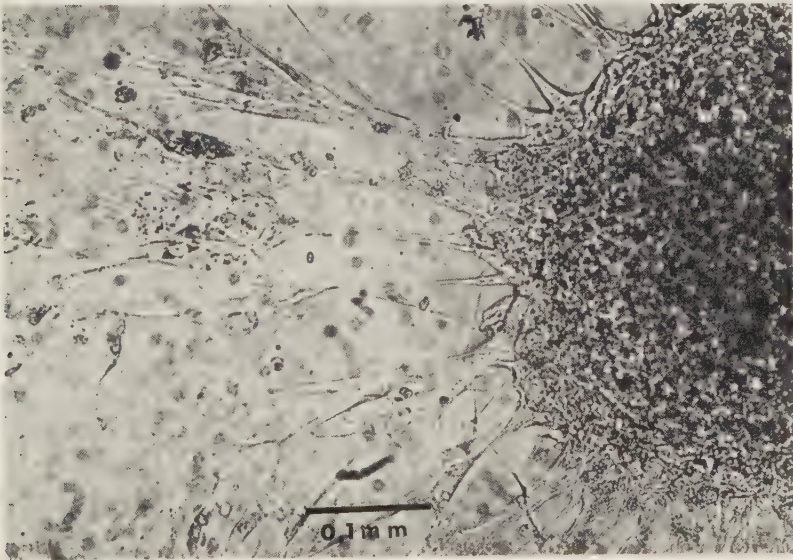


Abb. 3.22: Lichtmikroskopische Aufnahme eines Zellklons in vitro gezüchteter Glioblastomzellen vom Menschen

Von dem riesigen Zellklon (rechte Bildhälfte) wachsen sternförmig Glioblastomzellen aus. Ihr Wachstumspotential und ihre starke Proliferationstendenz sind an den gehäuften Mitosen und den prominenten Nukleoli zu erkennen. Außerdem kann man mehrschichtiges Wachstum beobachten, das ein wesentliches zellbiologisches Kriterium für Tumorzellen in vitro darstellt.

Die meisten dieser Kulturen konnten nach 8 bis 10 Tagen erstmals subkultiviert werden. Trotz konstanter Wachstumsbedingungen variierte die Anzahl der Subkulturen von 5 bis über 100 bei den einzelnen Proben. Ein gewisser Zusammenhang zwischen Malignitätsgrad und Wachstumseigenschaften konnte ermittelt werden. Einige gut wachsende Zelllinien wurden elektronisch mit flüssigem Stickstoff kryopräserviert. Danach ließen sich 60 bis 80% der Zellen nach Auftauen wieder revitalisieren. Damit war die Möglichkeit geschaffen, Gliomzellen jederzeit zur Verfügung zu haben, von denen bei Bedarf größere Mengen zur Membranantigenpräparation produziert werden konnten.

Auch von normalen menschlichen Gliazellen ließen sich Kulturen anlegen. Die Proliferationsrate lag jedoch ganz beträchtlich unter der von Gliomzellen, so daß nur in einigen Fällen Subkulturen gelangen. Dennoch konnte genügend Material als Kontrolle für die immunologischen Versuche gewonnen werden.

Von den *in vitro* gezüchteten Gliomzellen wurden in analoger Weise Membranen isoliert und davon ein Schall- und Tritonextrakt hergestellt. Diese Proben wurden gegen ein Antiserum getestet, das gegen das aus frischen Tumoren gewonnene Antigen hergestellt worden war. Im Immundiffusionstest zeigte sich eine deutliche Präzipitationsbande; sie ging in die Bande über, die sich mit dem Antigen aus frischen Tumoren bildete. Die beiden Banden sind somit identisch (Abb. 3.23) und man kann daraus den Schluß ziehen, daß das gliomassozierte Membranantigen auch von *in vitro* gezüchteten Tumorzellen gebildet wird.



Abb. 3.23: Immundiffusionstest eines Antigliomserums gegen Antigenpräparationen *in vitro* gezüchteter Gliomzellen

- (1) Tritonextrakt von Gliomkultur-1
- (2) Tritonextrakt von Gliomkultur-2
- (3) Tritonextrakt von Gliomkultur-3
- (4) Tritonextrakt von Gliomkultur-4
- (5) Tritonextrakt von Gliomkultur-5
- (6) Tritonextrakt von Tumormaterial

Analoge Ergebnisse wurden auch mit der Gegenstromelektrophorese erhalten, wobei die Membranextrakte aus normalen menschlichen Gliazellen keine Reaktion zeigten.

Mit Hilfe der wesentlich empfindlicheren Methode der indirekten Immunfluoreszenz ließen sich diese Befunde substantivieren. Dabei zeigte sich, daß die spezifische Fluoreszenz auf die Zellmembran beschränkt war (Abb. 3.24), während intrazelluläre Membranstrukturen wie Kerne, Mitochondrien oder Membranen des endoplasmatischen Retikulums nicht angefärbt wurden. Kern und Nukleolus ließen sich durch Gegenfärbung mit Rhodamin sichtbar machen.

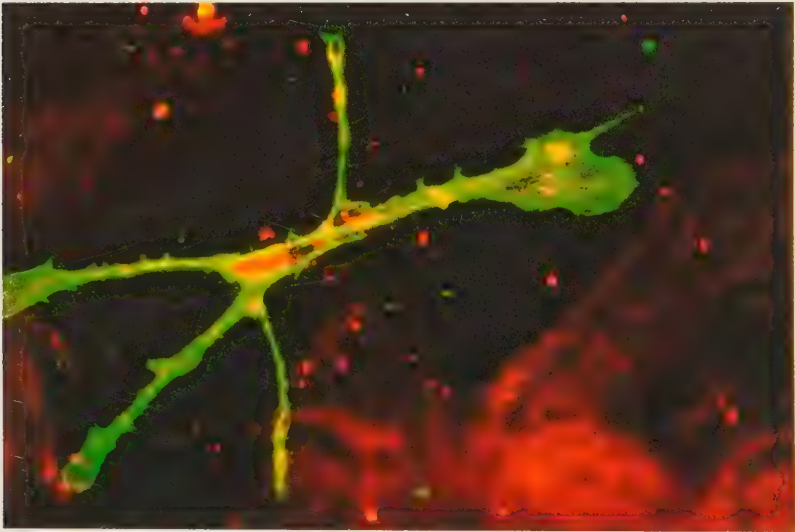


Abb. 3.24: Markierung eines tumorspezifischen Zellmembranantigens bei menschlichen Gliomzellen mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz.

Die grüne Fluoreszenz ist spezifisch und an die Membran assoziiert. Intrazelluläre Strukturen wie Kerne, Mitochondrien oder Membranen des endoplasmatischen Retikulums zeigen keine grüne Fluoreszenz. Man kann sie jedoch durch Gegenfärbung mit Rhodamin sichtbar machen. Auf diese Weise erkennt man den Kern und den sehr prominenten Nukleolus an seiner roten Farbe.

Die an menschlichen Gliomen erhobenen Befunde können wie folgt zusammengefaßt werden:

- 1. Zellmembranen dieser Tumoren enthalten eine Komponente die in normalen Gliazellen fehlt.*
- 2. Es dürfte sich dabei um ein tumorspezifisches Protein handeln, das von in vitro gezüchteten Gliomzellen auch in Kultur noch synthetisiert wird.*
- 3. Von menschlichen Gliomen können permanente Zellkulturen etabliert werden, die nach Kryopräservierung jederzeit zur Verfügung stehen. Dadurch ist man größtenteils unabhängig von frischem Operationsmaterial, das erstens nicht ständig und zweitens nicht in ausreichender Menge zur Verfügung steht.*

Auf Grund dieser Befunde war es naheliegend festzustellen, ob in anderen Tumoren ähnliche tumorassoziierte Proteine vorhanden sind und inwieweit die tumorassoziierten Antigene der verschiedenen Tumoren miteinander verwandt sind.

3.3. Untersuchungen an Nierenkarzinomen

3.3.1. Identifizierung tumorassoziierter Komponenten

In den primären Studien an Nierenkarzinomen wurde auf die aufwendige Membranisolierung verzichtet und zunächst nur der Schallextrakt des Tumorhomogenats untersucht.

Ein elektrophoretischer Vergleich des Schallextraktes von Nierenkarzinomen mit dem von Normalniere zeigte kaum Unterschiede im Proteinmuster (Abb. 3.25).

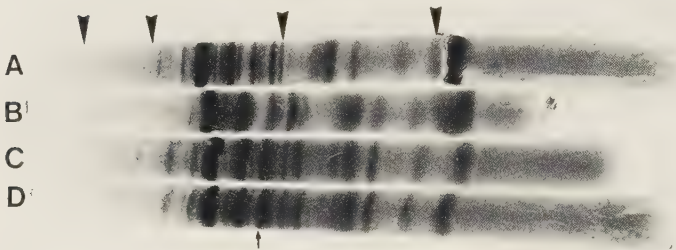


Abb. 3.25: Elektrophoresemuster des Schallextraktes von Nierenkarzinom- und Normalnierenhomogenat

- (A) Nierenkarzinomextrakt (Auftrennung im logarithmischen Gel)
- (B) Nierenkarzinomextrakt (Auftrennung im linearen Gel)
- (C) Normalnierenextrakt (Auftrennung im logarithmischen Gel)
- (D) Normalnierenextrakt (Auftrennung im linearen Gel)

Nach densitometrischer Analyse fand man jedoch im Tumormuster 4 zusätzliche Proteinbanden, von denen eine im hochmolekularen, zwei im mittleren und eine im niedermolekularen Bereich lokalisiert waren. Im Muster der Normalniere trat nur eine Bande auf, die im Tumormuster fehlte. Sie wanderte in den mittleren Molekulargewichtsbereich. Auffallend war ferner, daß die am raschesten wandernde Bande im Muster der Normalniere wesentlich schwächer als im Tumormuster war. Bei gleicher Gesamtproteinkonzentration bedeutete dies, daß ihre Konzentration im Normalnierengewebe vermindert war.

Um nachzuweisen, ob eine der nur im Tumormuster vorkommenden Proteine tumorspezifisch sein könnte, wurde analog den Versuchen beim Melanom und Gliom gegen den Schall-extrakt von Nierenkarzinomen ein Antiserum hergestellt.

Im Immundiffusionstest fand man eine Reihe von Banden gegen Tumormaterial und gegen Normalniere, die weitgehend identisch waren (Abb. 3.26).

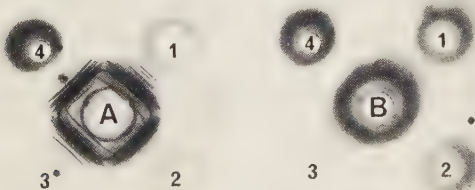


Abb. 3.26: Immundiffusionstest eines Antiserums gegen Nierenkarzinom-Schallextrakt.

- (A) Unadsorbiertes Antiserum
- (B) Gegen Normalnierengewebe adsorbiertes Antiserum
- (1) Nierenkarzinomextrakt von Nierenkarzinom-1
- (2) Normalniereextrakt
- (3) Nierenkarzinomextrakt von Nierenkarzinom-2
- (4) Normalniereextrakt

Die etwa 10 gegen verschiedene Normalnierenproteine gerichteten Antikörper des Antinierenkarzinomserums lassen sich durch Adsorption an Normalnierengewebe eliminieren. Das adsorbierte Serum reagiert nurmehr gegen Nierenkarzinomextrakt.

Gegen Tumormaterial traten jedoch zwei zusätzliche Banden auf. Die mit Tumor- und Normalgewebe produzierten Banden sollten sich durch Inkubation mit Normalhomogenat wegadsorbieren lassen, wenn sie ausschließlich durch Antikörper gegen Normal-komponenten hervorgerufen worden sind. Dies gelang tatsächlich durch wiederholte Adsorptionen. Damit konnten alle Antikörper, die gegen Normalnierenproteine gebildet worden sind, aus dem Antiserum gegen Nierenkarzinom herausgeholt werden. Das adsorbierte Antinierenkarzinomserum enthielt danach nur mehr Antikörper gegen Tumorproteine (Abb. 3.26, B).

3.3.2. Nachweis tumorspezifischer Antigene bei in vitro gezüchteten Nierenkarzinomzellen

Von jedem uns postoperativ zur Verfügung gestellten Nierenkarzinom wurden Primärkulturen angelegt. Wenn makroskopisch noch Normalnierengewebe an der entfernten Niere zu erkennen war, wurde auch von diesem Zellen zu kultivieren versucht. War das Gewebe steril entnommen worden und die Niere auch nicht durch Einbruch des Tumors ins Kelchsystem infiziert, gelang es, Kulturen von Karzinom- und Normalnierzellen zu etablieren. In der Momentaufnahme unterschieden sich die Karzinomzellen nicht wesentlich von den Normalzellen (Abb. 3.27). Erst bei genauerer Betrachtung fiel auf, daß sich bei den Tumorzellen atypische Kernfiguren erkennen ließen und die Mitoserate deutlich über der der Normalzellen lag. Daneben konnte man auch vereinzelt mehrschichtiges Wachstum erkennen. Schließlich nahmen die Tumorzellen nach wiederholter Subkultivierung mehr fibroblastenähnliche Struktur an.

Analog den Untersuchungen an Melanomen und Gliomen wurden die Nierenkarzinomzellen mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz untersucht. Eine positive Fluoreszenz konnte mit dem adsorbierten Antiserum nur bei Nierenkarzinomzellen beobachtet werden. Die aus frischem Tumormaterial gewonnenen Karzinomzellen und auch die Normalzellen zeigten eine wesentlich stärkere Fluoreszenz, die nicht allzu spezifisch war, da sie sowohl in Tumor- wie in Normalzellen auftrat. Sie dürfte auf einer unspezifischen Bindung von im Blut zirkulierenden tumorspezifischen Antikörpern oder Antigen-Antikörperkomplexen beruhen. Diese Komplikation könnte mittels Zellkultur ausgeschaltet werden, da bei in vitro kultivierten Zellen die Assoziation von zirkulierenden Antikörperkomplexen wegfiele.

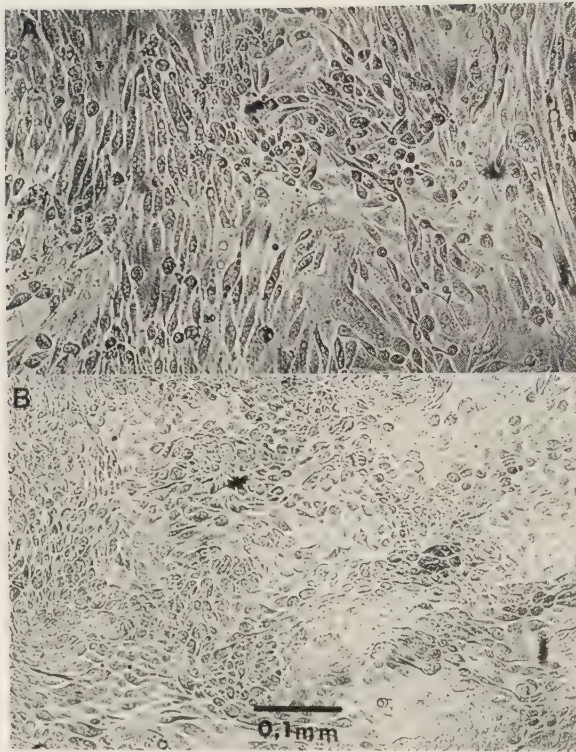


Abb. 3.27: Lichtmikroskopisches Bild *in vitro* gezüchteter Zellen von Nierenkarzinom (A) und Normalnierengewebe (B)

3.4. Immunologische Untersuchungen von menschlichen Seren

3.4.1. Nachweis tumorspezifischer zirkulierender Antikörper im Serum von Melanompatienten

Nachdem gezeigt werden konnte, daß der Ultraschall- und der Tritonextrakt von Zellmembranen menschlicher Melanome tumorspezifische Antigene enthielt, das in allen bisher untersuchten menschlichen Melanomen nachweisbar war, war die Frage, ob Melanompatienten Antikörper gegen dieses Antigen produzieren. Wenn ja, sollten diese Antikörper im Serum nachweisbar sein. Zur Steigerung der Empfindlichkeit des Nachweises wurde aus dem Serum der Patienten die Immunglobulinfraktion isoliert und diese in der gegenüber der Immundiffusion zehnfach empfindlicheren Gegenstromelektrophorese untersucht. Von 10 Patientenseren, bei denen ein malignes Melanom histologisch bestätigt wurde, zeigten 7 eine Kreuzreaktion mit dem verwendeten Testantigen. Ein Serum, bei dem das Melanom nicht einwandfrei diagnostiziert worden ist, gab ebenfalls eine Präzipitationslinie. Von den untersuchten Kontrollseren bzw. der daraus gewonnenen Immunglobulinfraktion reagierten 2 mit deutlicher Präzipitation und zwei mit schwacher Bande. Eine mögliche Erklärung für die Reaktion der Normalseren wäre entweder die Annahme, daß die Seren von Patienten stammen, die ein Melanom hatten, das sich im subklinischen Stadium zurückbildete, oder die Seren enthielten Antikörper gegen Normalmelanozytenantigen. Letztere Annahme ist jedoch eher unwahrscheinlich. Nachdem das als Testantigen verwandte Melanomprotein zum Teil auch noch normale Komponenten enthielt, wären Autoantikörper zumindestens theoretisch denkbar.

Die unterschiedliche Intensität der Präzipitationslinien der Patientenseren (Abb. 3.28: B-1, B-3, B-8 und B-10) bei gleicher Proteinkonzentration der Immunglobulinfraktion dürfte auf unterschiedlichem Antikörpertiter in den Proben beruhen und auf eine variable Plasmazellaktivität hindeuten.

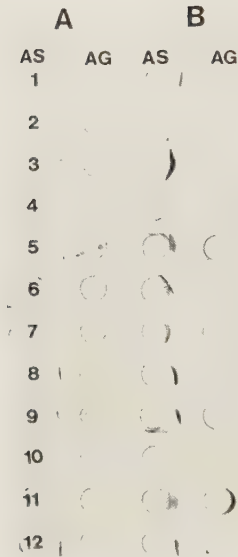


Abb. 3.28: Gegenstromelektrophorese zur Testung von Melanom-patientenserum

Als Testantigen wurde der Ultraschallextrakt von Zellmembranen aus Melanom-2 verwendet. Die Immunglobulinfraktion folgender Seren wurde untersucht:

A-1: Normalserum-1
A-2: - " - -2
A-3: - " - -3
A-4: - " - -4
A-5: - " - -5
A-6: - " - -6
A-7: - " - -7
A-8: - " - -8
A-9: - " - -9
A-10: - " - -10
A-11: - " - -11

B-1: Patientenserum-1
B-2: - " - -2
B-3: - " - -3
B-4: - " - -4
B-5: - " - -5
B-6: - " - -6
B-7: - " - -7
B-8: - " - -8
B-9: - " - -9
B-10: - " - -10

B-11: Patientenserum mit nicht gesichertem Melanom

A-12: Antimelanom-Kaninchenserum

B-12: Antimelanom-Kaninchenserum

3.4.2. Nachweis tumorspezifischer zirkulierender Antikörper im Serum von Gliompatienten

Zum Nachweis zirkulierender Antikörper im Serum von Gliompatienten wurde der Ultraschall-extrakt von Zellmembranen menschlicher Gliome herangezogen. Bisher wurden 22 Patientenserum untersucht, wovon bei 2 Patienten die Diagnose wegen der Inoperabilität neuropathologisch nicht gesichert werden konnte. Von den 20 gesicherten Gliomserum zeigten 16 eine Reaktion mit dem Gliommembranantigen. Alle bisher getesteten Serum von normalen Spendern waren negativ, zeigten also keine Präzipitationsbanden in der Gegenstromelektrophorese (Abb. 3.29). Auf Grund der Intensität der Präzipitationslinien ließ sich abschätzen, daß die einzelnen Patienten einen unterschiedlichen Gehalt an tumorspezifischen Antikörpern enthielten. Die Tumorspezifität der Antikörper im Patientenserum konnte durch Blockierversuche gezeigt werden. Die Immunglobulinfraktion des Patientenserum konnte das Antigen binden und damit die Reaktion mit einem spezifischen Antigliomkaninchenserum unterdrückt werden.

In 3 Fällen konnte die Antikörperproduktion über einen längeren Behandlungszeitraum verfolgt werden. Dabei stellte sich heraus, daß sich der Antikörpertiter eines Patienten nicht wesentlich änderte, weder nach chirurgischer noch nach chemotherapeutischer Behandlung. Die Interpretation dieser Befunde ist nicht einfach. Man kann nur vermuten, daß ein antigener Stimulus vielleicht in Form eines subklinischen Tumors ständig vorhanden ist, der die Plasmazellen kontinuierlich zur Antikörperproduktion anregt.



Abb. 3.29: Gegenstromelektrophorese zur Testung von Gliompatientenseren

Als Testantigen wurde der Ultraschallextrakt von Zellmembranen aus menschlichen Gliomen verwendet. Die Immunglobulinfraction folgender Seren wurde untersucht:

A-1:	Patientenserum	GS-1	B-1:	Patientenserum	GS-15
A-2:	- " -	GS-2	B-2:	- " -	GS-13
A-3:	- " -	GS-3	B-3:	- " -	GS-12
A-4:	- " -	GS-4	B-4:	- " -	GS-14
A-5:	- " -	GS-5	B-5:	- " -	GS-16
A-6:	- " -	GS-6	B-6:	- " -	GS-20
A-7:	- " -	GS-7	B-7:	- " -	GS-17
A-8:	- " -	GS-8	B-8:	- " -	GS-18
A-9:	- " -	GS-9	B-9:	- " -	GS-19
A-10:	- " -	GS-10	B-10:	- " -	GS-21
A-11:	- " -	GS-11	B-11:	- " -	GS-26
A-12:	Antigliomkaninchen-		B-12:	Antigliomkaninchen-	
	serum (gegen Test-			serum (gegen Test-	
	antigen)			antigen)	

3.4.3. Nachweis tumorspezifischer zirkulierender Antikörper im Serum von Nierenkarzinompatienten

Bisher wurden Seren von 15 Nierenkarzinompatienten auf Antikörper untersucht, die gegen ein Nierenkarzinommembranantigen reagieren sollten. Testete man das Serum direkt, fand keine signifikante Präzipitation mit dem verwendeten Antigen statt (Abb. 3.30: A-1 bis A-10). Wurde dagegen die Immunglobulinfraction eingesetzt, erhielt man in 6 Fällen eine deutliche Reaktion. Nachdem die Empfindlichkeit der Reaktion durch die Anreicherung der Antikörper in der Immunglobulinfraction wesentlich gesteigert worden war, ließ sich damit zumindestens in 40% der Fälle eine positive Reaktion nachweisen. Bei Verwendung noch empfindlicherer radioimmunologischer Methoden müßten die positiven Befunde noch vermehrt werden können. Auf Grund der Ergebnisse der Gegenstromelektrophorese konnten die Seren 1N, 4-N, 6N, 8N, 9N und 10N als positiv angesehen werden, d.h. sie enthielten Antikörper gegen ein bestimmtes Nierenkarzinomantigen (Abb. 3.29: B 1, 4, 6, 8, 9 und 10). Diese Seren gaben zum Teil auch eine Kreuzreaktion mit einer Membranantigenpräparation aus dem makropathologisch normalen Anteil der Karzinom-tragenden Niere. Dagegen waren Antigenpräparationen aus Normalnierengewebe gesunder Individuen stets negativ. Diese Befunde lassen vermuten, daß in dem makropathologisch normal aussehenden Gewebe der Karzinomniere möglicherweise bereits tumorspezifische Membranantigene gebildet werden. Eine andere Möglichkeit wäre, daß die tumorspezifischen Antigene via Antigen-Antikörperkomplexe in den noch funktionierenden Normalnierenanteil gelangen und dort gewissermaßen durch den Filtrationsprozeß der Niere angereichert werden, weil diese hochmolekularen Komplexe nicht passieren können. Diese Überlegungen sollten bei der Verwendung des Normalnierenanteils einer Karzinom-befallenen Niere als Referenzgewebe berücksichtigt werden.

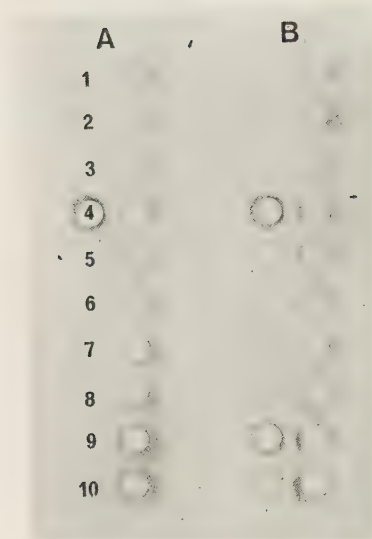


Abb. 3.30: Gegenstromelektrophorese zur Testung von Nierenkarzinompatientenseren

Als Testantigen wurde der Ultraschall-extrakt von Zellmembranen aus Nierenkarzinomen-4N verwendet. Folgende Seren wurden untersucht:

A-1:	Patientenserum-1N	B-1:	Immunglobulinfraktion-1N
A-2:	- " - 2N	B-2:	- " - 2N
A-3:	- " - 3N	B-3:	- " - 3N
A-4:	- " - 4N	B-4:	- " - 4N
A-5:	- " - 5N	B-5:	- " - 5N
A-6:	- " - 7N	B-6:	- " - 7N
A-7:	- " - 9N	B-7:	- " - 9N
A-8:	- " - 11N	B-8:	- " - 11N
A-9:	- " - 13N	B-9:	- " - 13N
A-10:	- " - 15N	B-10:	- " - 15N

Signifikante Fräzipitationslinien sind mit B-1, B-4, B-6, B-8, B-9 und B-10 nachgewiesen wurden. Die Seren der Nierenkarzinompatienten waren dagegen alle negativ.

Die mit Hilfe der Gegenstromelektrophorese erhobenen Befunde konnten durch indirekte Immunfluoreszenz untermauert werden. Autologes Patientenserum zeigte eine signifikante Membranfluoreszenz mit einigen der frisch isolierten Nierenkarzinomzellen (Abb. 3.31, weiße Zeichen).

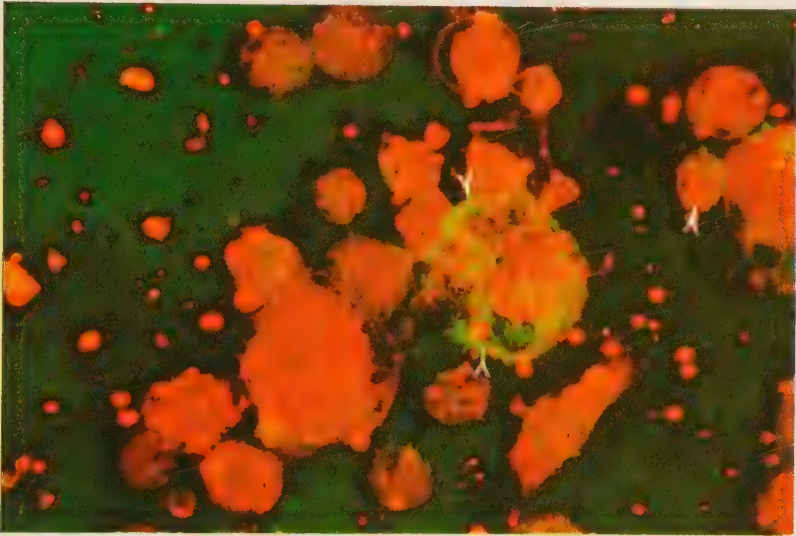


Abb. 3.31: Indirekte Immunfluoreszenz bei menschlichen Nierenkarzinomzellen unter Verwendung autologen Patientenserums

Daraus kann man schließen, daß die Patienten gegen spezifische Membranantigene ihrer Tumorzellen Antikörper ausbilden. Wie zu beobachten war, trat eine Antikörperbindung (sprich: Fluoreszenzmarkierung) nicht an allen Zellen auf. Eine plausible Erklärung dafür wäre, daß entweder nicht alle Tumorzellen das bestimmte Membranantigen ausbilden oder daß die Zellsuspension auch noch normale Nierenparenchymzellen enthält. Wie dem auch sei, mit Hilfe der Immunfluoreszenz lassen sich tumorspezifische Antikörper im Patientenserum nachweisen. Außerdem lassen sich mit einem positiven Patientenserum Nierenkarzinomzellen als solche identifizieren.

4. D I S K U S S I O N

4.1. Zelluläre und humorale Immunabwehr bei malignen Tumoren

Die Forschung auf dem Gebiet der Tumorimmunologie hat sich in jüngster Zeit derart ausgeweitet, daß es selbst dem Spezialisten auf diesem Gebiet schwerfällt, die einzelnen Phänomene synoptisch zu koordinieren und zu bewerten. Die meines Erachtens entscheidenden Punkte der gegenwärtigen Problematik lassen sich auf zwei Fragen reduzieren:

1. Wie reagiert der Organismus auf die Entartung einer Krebszelle?
2. Wieso gelingt es der Tumorzelle, die mehrfachen Schutzbarrieren der Immunabwehr zu durchbrechen?

Umfaßt die erste Frage die Probleme der Grundlagenforschung, so verdeutlicht die zweite Frage die ganze klinische Relevanz der Tumorimmunologie.

Im Beantwortung der ersten Frage läßt sich folgendes sagen: Jedes Fremdartigen wird vom Organismus erkannt. Es stimuliert dessen Immunabwehr, die das Antigen zu eliminieren versucht.

Das immunologische Abwehrsystem setzt sich aus zellulären und humoralen Komponenten zusammen, die eng miteinander kooperieren (Abb. 4.1). An der zellulären Reaktion sind 3 Zellarten beteiligt: die T-Lymphozyten, die B-Lymphozyten und die Makrophagen. Das humorale System umfaßt alle im Blut zirkulierenden löslichen Komponenten, also Antikörper, Komplement und Lymphokine, ein Überbegriff für alle die Lymphozyten und Makrophagen beeinflussenden Faktoren.

Der relative Anteil des zellulären und humoralen Systems hängt weitgehend vom jeweiligen Fremdartigen ab. So gibt es reine T-Zellantigene, die nur die T-Lymphozyten stimulieren sowie reine B-Zellantigene, die nur die B-Lymphozyten beeinflussen und zur Antikörperproduktion motivieren.

Die erste Barriere gegen ein Neoantigen wird durch das zelluläre System gebildet. Bei einer Krebszelle sind es die tumorspezifischen Zellmembranantigene, die von ganz bestimmten Lymphozyten erkannt werden. Durch diese werden die Immunzellen angelockt, assoziieren sich mit den Antigene-tragenden Strukturen und zerstören sie.

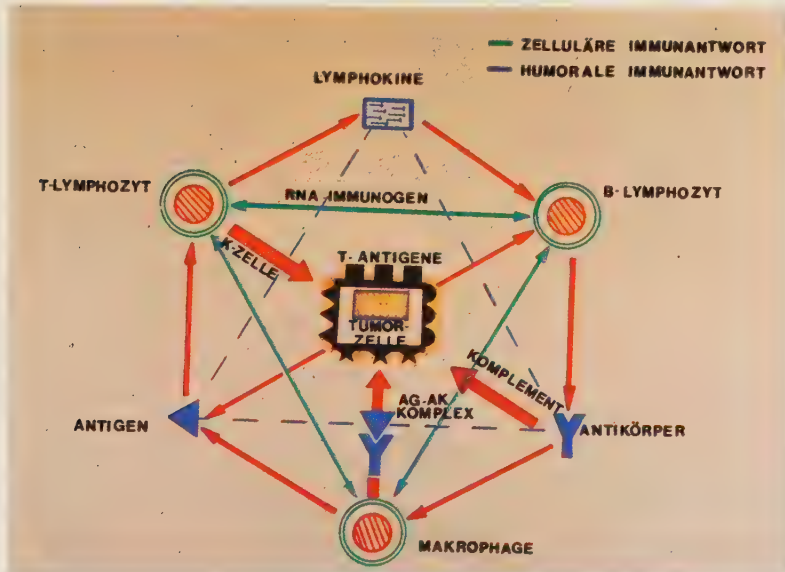


Abb. 4.1: Schema zur zellulären und humoralen Immunabwehr bei malignen Tumoren

Das zelluläre System besteht aus den T-Lymphozyten, den B-Lymphozyten und den Makrophagen. Das humorale System setzt sich zusammen aus den tumorspezifischen Antikörpern, dem Komplement sowie den Lymphokinen, womit alle die Lymphozyten und Makrophagen beeinflussenden Faktoren gemeint sind. Dazu gehören die Immun-RNA, der Makrophagenmigrationshemmende Faktor und der Lymphozytenmigrationshemmende Faktor sowie eine Reihe bisher noch nicht identifizierter Stimulatoren und Inhibitoren.

Es gibt Zellen des Immunsystems, die diese Fähigkeit von vornherein besitzen, ohne daß sie jemals mit der Tumorzelle in Kontakt getreten sind. Sie werden in Anlehnung an das

Angelsächsische als "Killer" oder abgekürzt als K-Zellen bezeichnet. Auf der Basis ihrer Funktion könnte man sie auch als Tötungslymphozyten verstehen, wodurch die Abkürzung T-Lymphozyten eine funktionelle Bedeutung erhalten würde. Die Zerstörung einer Tumorzelle durch eine Killerzelle hängt im wesentlichen von der Lokalisation der Neoantigene ab. Die höchste Aktivität zeigen Killerzellen gegen Tumorzellen, die eine hohe Konzentration an tumorspezifischen Antigenen in ihrer Membran besitzen. Tumorspezifische Kern- oder Zytosolantigene rufen erst dann eine Immunreaktion hervor, wenn die Tumorzelle zerfallen ist, da die intrazellulären Tumorantigene erst dann der Immunabwehr zugänglich werden.

Die Reaktionen des zellulären Immunsystems bestehen im wesentlichen aus einer Zytolyse, die durch die T-Lymphozyten, die B-Lymphozyten oder die Makrophagen induziert sein kann. Drei Mechanismen spielen dabei eine zentrale Rolle (Abb. 4.2):

1. Die T-Zell-Zytotoxizität (TZZ),
2. die Antikörper-abhängige Zytolyse (AAZ) und
3. die Zytolyse durch "armierte" Makrophagen (AM)

Der erste Mechanismus spielt die dominierende Rolle bei der Abstoßung von Tumoren und Transplantaten. Entdeckt wurde er durch die Reaktionslosigkeit thymusfreier und damit T-Zell-insuffizienter Mäuse gegenüber Tumortransplantaten. Erst nach Substitution reiner syngener T-Lymphozyten konnte bei diesen Tieren eine Abstoßungsreaktion in Gang gesetzt werden. Eine gesteigerte Reaktion konnte durch T-Zellen erreicht werden, die vorher gegen Tumor- oder Histokompatibilitätsantigene sensibilisiert worden waren. Nach allen bisher bekannten Befunden scheinen an dieser Abstoßungsreaktion nur die T-Lymphozyten beteiligt zu sein. Ihre Fähigkeit dazu erhalten sie durch den Kontakt mit dem Tumorantigen. Durch dieses werden sie stimuliert und differenzieren sich über Lymphblasten zu immunkompetenten, morphologisch kleinzelligen Lymphozyten, die ein immunologisches Gedächtnis besitzen.

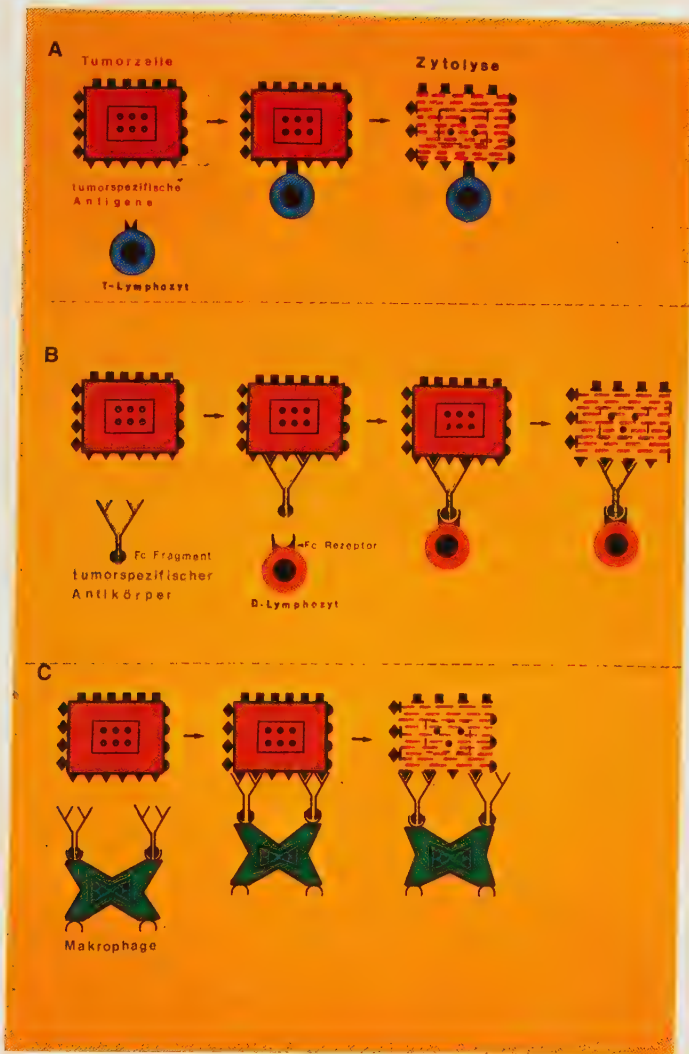


Abb. 4.2: Mechanismen der zellulären Immunantwort

A) T-Zell-Zytotoxizität (TZZ)

B) Antikörper-abhängige Zytolyse (AAZ)

C) Zytolyse durch "armierten" Makrophagen (AM)

Dieses erlaubt ihnen, auf neuerlichen Antigenkontakt sofort zu reagieren.

Die zytotoxische Reaktion der T-Zellen läuft in 2 Phasen ab. In der ersten kontaktieren die ausgereiften T-Lymphozyten mit ihren auf Tumorantigen spezialisierten Rezeptoren die neoplastische Zelle und assoziieren sich an diese. Die Adhärenz ist spezifisch und für die spätere Zellyse essentiell. Sie läuft unter Energieverbrauch in 5 bis 10 Minuten ab und kann durch Erhöhung der Konzentration an zyklischem Adenosinmonophosphat im Lymphozyten gehemmt werden. Die zweite Phase ist der eigentliche lytische Prozeß, der mehrere Stunden in Anspruch nimmt. Er kann auch in Abwesenheit der Lymphozyten ablaufen und endet mit dem Auflösen der Zellmembran. Die Ursache für diese Lyse ist weitgehend unbekannt. Man nimmt jedoch an, daß die Membranpermeabilität der Tumorzelle durch lymphozytäre Faktoren, möglicherweise Lysolezithine, fortschreitend verändert wird, wodurch die osmotische Regulation der Zelle aufgehoben wird und die Membran schließlich rupturiert.

Der zweite Mechanismus der zellulären Immunabwehr läuft über die Antikörper-abhängige Zytolyse (Abb. 4.2 B). Antikörper beladene Tumorzellen können spezifisch durch normale nicht-sensibilisierte Lymphozyten lysiert werden. Die tatsächlichen Effektorzellen konnten bisher keiner Lymphozytenart zugeordnet werden. Mit Sicherheit sind es keine T-Lymphozyten. Bisher sind sie allein durch ihre Rezeptoren für das sogenannte Fc-Fragment von Antikörpermolekülen charakterisiert. Diese konstante Region des Antikörpermoleküls wird von der Effektorzelle registriert, weil sie von der Zelloberfläche wegsteht. Es ist also jener Molekülteil, der nicht mit dem Antigen reagiert. Solche Fc-Rezeptoren findet man bei Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, B-Lymphozyten und K-Zellen.

Nach diesem Mechanismus der Antikörper-gebundenen Zytolyse werden zahlreiche Teilchen-assoziierte Antigene wie Bakterien und Pilze eliminiert. Die Reaktion läuft unter Verbrauch von Komplement ab. Nur Immunglobuline der Klasse G (IgG) wirken in diesem System. IgM und IgA zeigen keine lytische Aktivität. Außerdem müssen die Zielzellen, im speziellen die Tumorzelle, vorher mit dem Antikörper reagiert haben, der für das betreffende Antigen spezifisch ist. Inkubiert man Lymphozyten mit normalen IgGs, sind diese nicht imstande, die Zellen aufzulösen. Das impliziert weiter, daß es sich bei den Antikörpern um tumorspezifische handeln muß und nicht um sogenannte zytophile, die sich unspezifisch an die Lymphozytenoberfläche anlagern, aber nicht reagieren.

Darin kann der wesentliche Unterschied gegenüber der Reaktion der "armierten" Makrophagen gesehen werden, die primär ohne Antikörper imstande sind, Tumorzellen unter Schonung der gesunden normalen Zelle abzutöten. Dieser zytotoxische Effekt der Makrophagen wird erst dann spezifisch, wenn sich nach Kontakt mit der Tumorzelle Tumorantigen-registrierende Rezeptoren an der Makrophagenoberfläche ausbilden. Der Kontakt zwischen Tumorzelle und armiertem Makrophagen ist für die Spezifität dieses Mechanismus entscheidend. Demnach muß der Makrophage zum Ort des Geschehens wandern. Der danach ausgebildete Rezeptor für Tumorantigen, der die eigentliche Armierung, also "Bewaffnung", des Makrophagen darstellt, ist nur so lange aktiv, wie der Antigenstimulus vorhanden ist. Danach geht die zytotoxische Wirkung des Makrophagen verloren, obwohl er durch das Rezeptormolekül weiter armiert bleibt. Er kann nach neuerlichem Antigenkontakt wieder aktiv werden.

Eine weitere Funktion der Makrophagen besteht in der Potenzierung der im Organismus vor dem Antigenkontakt vorhandenen Abwehrkapazität. Fremdantigene, ob löslich oder Teilchen-gebunden, werden durch sie phagozytiert und in sonderbarer Weise aufbereitet (Abb. 4.3). Dabei entsteht eine Nukleinsäure, die sogenannte Immun-RNA, oder auch

RNA-Immunogen genannt, die eine Information für die Zellen des Abwehrsystems enthält. Diese Information lautet in Kurzform: Differenziert euch in der Weise, daß ihr das spezifische Tumorentigen erkennt und eliminieren könnt! Diese Immun-RNA ist der eigentliche Stimulus für die immunkompetenten Zellen. Unter ihrem Einfluß differenzieren sie sich von der immunologischen Stammzelle über wiederholte Teilungen zu aktiven Lymphozyten. Bei dieser Differenzierung entstehen die spezifischen Rezeptoren, die das Gedächtnis der Lymphozyten bewirken.



Abb. 4.3: Schema zur Funktion der Makrophagen bei der Verarbeitung von Tumorentigenen

Das Neoantigen wird vom Makrophagen (MAC) phagozytiert und zu einem RNA-Immunogen (Immun-RNA) umgewandelt. Dieses RNA-Immunogen enthält eine Information für den Lymphozyten, der dieses Signal aufnimmt, verarbeitet und mit der Synthese spezifischer Rezeptoren und anderer Immunkomponenten beantwortet.

Aus den B-Lymphozyten entstehen durch diese Differenzierung die Plasmazellen, die die Fähigkeit zur Antikörperproduktion besitzen. Jede Plasmazelle produziert Immunglobuline gegen eine einzige Antigenart, also z.B. nur gegen ein Membranantigen oder gegen ein Kern- oder gegen ein zytosolisches Antigen (Abb. 4.4). Anders ausgedrückt, für jedes bestimmte Antigen ist ein Plasmazellstamm notwendig. Seine Produktivität ist allerdings enorm hoch. Er ist imstande, 2000 Antikörpermoleküle pro Sekunde und pro Zelle zu bilden.

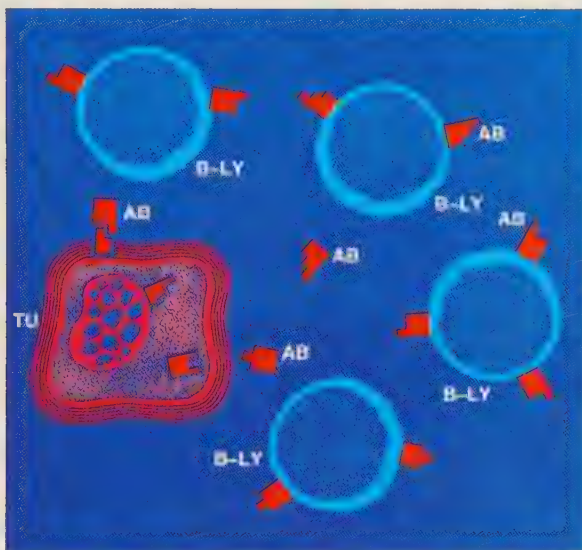


Abb. 4.4: Schema zur Differenzierung der B-Lymphozyten in Antikörper-produzierende Plasmazellen

Jeder differenzierte B-Lymphozyt (B-LY) produziert Antikörper (AB) gegen eine einzige Antigenart.

Die wichtigsten im menschlichen Serum nachweisbaren Antikörperklassen sind: IgG, IgM und IgA. IgG und IgM sind gegen Bakterien und Viren gerichtet, wogegen IgA vorrangig gegen Viren wirkt. Neben ihrer Molekülstruktur unterschei-

den sich diese Immunglobuline auch in ihrer biologischen Halbwertszeit. Sie beträgt bei IgG 14 bis 28 Tage, bei IgM 5 Tage und bei IgA 4 Tage. Nur Immunglobuline der Klasse G sind Plazenta-gängig und stellen damit den einzigen Schutz im fetalen Leben dar.

Nachdem die Immunglobulinsynthese eine Latenzphase von 1 bis 2 Tagen hat, kann es in bestimmten Situationen zu einem Antikörpermangel kommen.

Wie kurz angedeutet, können die von den B-Lymphozyten sezernierten, im Blut zirkulierenden Antikörper in 2 bevorzugten Richtungen wirksam werden. Ein Teil assoziiert sich mit den Makrophagen, der andere Teil greift in Zusammenspiel mit den Komplementfaktoren die Tumorzelle an und zerstört sie (siehe auch Abb. 4.1).

Makrophagen können aber auch unspezifisch stimuliert werden, wie es bei chronischen Infekten durch Bakterien oder Pilze der Fall ist. Auch in diesem Zustand entfalten sie einen stark wachstumshemmenden Effekt auf neoplastische Zellen, und die Wirkung der unspezifischen Immuntherapie bestimmter Malignome mit BCG ("Bacillus Calmette Guerin"), Laevamisol, Coryne bacterium parvum oder Dinitrochlorbenzol dürfte darauf beruhen.

Bei kritischer Beurteilung dieses Phänomens drängt sich einem die Frage auf, wie und wieso können nicht spezifisch aktivierte Makrophagen zwischen normalen und neoplastischen Zellen unterscheiden? Denkbar wäre, daß alle Tumorzellen, unabhängig vom Differenzierungsgrad sowie vom Ort ihrer Genese, ein gemeinsames Oberflächenantigen tragen, an dem sie vom Makrophagen erkannt werden können. Obwohl der definitive Beweis dafür noch aussteht, gibt es doch einige Befunde, die diese Annahme untermauern.

4.2. Das immunologische Überwachungssystem und die tumorspezifischen Ausschaltungsmechanismen

Aus dem bisher gesagten ist klar geworden, daß eine Tumorzelle von mehreren Barrieren eingeschlossen und mit den verschiedensten Mitteln bekämpft wird. Manche Forscher formulieren es noch überspitzt, indem sie behaupten, ein Tumor wächst gerade deshalb, weil es ein immunologisches Überwachungssystem gibt. Sie teilten dem Abwehrsystem demnach eine negative Rolle zu. Dies trifft jedoch sicherlich nicht zu. Dafür gibt es zahlreiche Beweise:

1. Ein, wie mir scheint, entscheidendes Argument dagegen ist das Wachstumspotential einer Tumorzelle, dessen Ursache in der Zelle selbst liegen muß. So zeigen neoplastisch umgewandelte Zellen in Kultur eine nahezu uneingeschränkte Vermehrungstendenz. Es gibt Zellen menschlicher Karzinome, die schon über 40 Jahre in Kultur gezüchtet werden. HeLa-Zellen sind das bekannteste Beispiel dafür. Normale nicht transformierte Zellen hingegen lassen sich zwar auch in vitro züchten, nach mehreren Subkulturen versiegt ihre Proliferationstendenz jedoch völlig. Nachdem sich in der in vitro Kultur wegen der Abwesenheit immunkompetenter Zellen keine immunologischen Reaktionen abspielen, läßt sich daraus ableiten, daß die faszinierenden Wachstumseigenschaften von der Tumorzelle selbst verursacht werden und nicht vom Immunsystem.
2. Ein weiteres Argument für eine positive Überwachungsfunktion des Immunsystems liegt in der Spontanremission, die in bemerkenswerter Anzahl menschlicher Malignome beobachtet werden konnte (Lewis, 1974; Hellström, 1972).
3. Wäre die obige Behauptung richtig, müßte eine Unterdrückung des Immunsystems auch zu einer Hemmung des Tumorwachstums führen. Es gibt zahlreiche Beispiele, daß man durch Immunsuppression Tumoren induzieren bzw.

ihre Progredienz verstärken kann. So wird die Transplantation experimenteller Tumoren im xenogenen System durch Immunsuppression der Empfängertiere in Form von Antilymphozytenserum, Thymektomie, Bestrahlung oder Zytostatika überhaupt erst möglich (Nagel, 1971; Kellen, 1973). Auch ist die Tumorinzidenz bei immunsupprimierten Nierentransplantatempfängern mehr als 50fach höher als bei nicht supprimierten.

Auf Grund dieser und noch zahlreicher anderer Überlegungen gibt es kaum Zweifel, daß auch beim Krebsgeschehen die immunologische Kontrolle eine Rolle spielt.

Man sollte sich daher mehr auf die Frage konzentrieren, welche Gründe dafür verantwortlich sind, daß trotz dieser Immunbarrieren aus einer einzigen Tumorzelle eine massive Krebsgeschwulst werden kann, die auch noch Metastasen setzen und dadurch den Tod des Individuums herbeiführen kann.

Sehr wahrscheinlich spielen dabei mehrere Phänomene eine Rolle. Zwei davon sind besonders wichtig:

1. Die Tumorzelle selbst mit ihren Antigenen, sowie deren Lokalisation und deren Verhalten.
2. Der Organismus, dessen Immunsystem defekt werden kann.

Die heute diskutierten Faktoren, die eine Ausschaltung der immunologischen Überwachung bewirken, sind in der folgenden Tabelle (Tab. 1) zusammengefaßt.

Tab. 1: Phänomene, die bei der Ausschaltung des immunologischen Überwachungssystems eine Rolle spielen

1. Spezielle Eigenschaften der Tumorzelle
 - 1.1. Antigenlokalisation
 - 1.2. Antigenmaskierung (Currie und Bagshawe, 1968; Sanford, 1967)
 - 1.3. Antigenmodulation (Old et al., 1968)
2. Spezielle Eigenschaften des Organismus
 - 2.1. Immunsuppression bedingt durch
 - 2.1.1. Genetische Faktoren
 - 2.1.2. Alter
 - 2.1.3. Stress
 - 2.1.4. Karzinogene
 - 2.1.5. Onkogene Viren
 - 2.1.6. Chemisch definierte Immunsuppressiva (Immurek, Cortison)
 - 2.1.7. Physikalische Immunsuppressiva (energiereiche Strahlen, Radioaktivität)
 - 2.2. Toleranz
 - 2.3. Immunologische Blockierfaktoren (Hellström und Hellström, 1969)

Über die Existenz eines immunologischen Überwachungssystems gibt es keinen Zweifel. Seine Reaktionen werden durch Fremdantigene in Gang gesetzt. Es ist daher leicht einzusehen, daß die Antigenlokalisation von großer Bedeutung ist. Auf Antigene, die von den Rezeptoren nicht registriert werden, weil sie entweder intrazellulär oder durch Antikörper bedeckt sind, reagiert der Organismus nicht. So können intrazelluläre Faktoren wie Mitose-stimulierende Faktoren oder DNA-Polymerasen,

die die Zelle zu einer gesteigerten Proliferation anzuregen vermögen, vom Immunsystem primär nicht erkannt werden, weil sich die Oberfläche der Zelle in diesem Fall nicht geändert hat. Die Zelle kann ohne erkennbare Membranveränderung proliferieren und schließlich einen Tumor, also eine massive Ansammlung von Tumorzellen ausbilden. Selbst wenn an der Zellmembran tumorspezifische Antigene ausgebildet werden, können diese durch andere Makromoleküle wie Antikörper, Serumproteine oder Sialomucine maskiert und dadurch für die Immunzellen nicht erkennbar sein (Currie und Bagshawe, 1968; Sanford, 1967).

Eine andere Alternative ist die der Antigenmodulation, bei der sich das Antigen an sich ändert. Sie konnte erstmals für das "TL"-Antigen der Maus nachgewiesen werden (Boyse et al., 1967). Dieses TL-Antigen entwickelt sich an Knochenmarkstammzellen nur dann, wenn diese in den Thymus einwandern. Voraussetzung ist allerdings, daß sie von einem TL-positiven Mäusestamm kommen. Werden nun TL-positive Leukämiezellen auf syngene TL-negative Tiere übertragen, die vorher gegen TL-Antigen immunisiert worden sind, so verlieren die Leukämiezellen ihr TL-Antigen (Old et al., 1968). Die Antigenmodulation ist nicht auf Leukämiezellen beschränkt; auch normale TL-positive Lymphozyten können in TL-negative Zellen umgewandelt werden. Von diesen Experimenten stammt auch die Abkürzung TL-Antigen, was Thymus-Lymphozyt-Antigen bedeutet. Die Antigenmodulation läuft über einen aktiven Stoffwechselvorgang ab, denn Inhibitoren der Nukleinsäuresynthese heben die Fähigkeit zur Antigenmodulation auf.

Eine wesentliche Rolle beim Tumorwachstum spielt zweifelsohne der Organismus selbst und sein Immunapparat. Alle Zellarten und die mit ihnen kommunizierenden Faktoren können verändert oder defekt sein. Es gibt eine Reihe von

äußeren Einflüssen, welche sich in einer Veränderung des Immunsystems niederschlagen. Dazu gehören Viren, chemische und physikalische Karzinogene, Immunsuppressiva, zunehmendes Alter, genetische Disposition und Stress in seiner ursprünglichen Bedeutung als Überforderung, die stets zu einer Störung bzw. Dekompensation biologischer Regelkreise führt. Eine Reihe von Befunden lassen sich hier einordnen. So haben immundefiziente Individuen eine erhöhte Tumorzidenz. Das gleiche gilt für immunsupprimierte Patienten, wovon die häufigsten Nierentransplantatempfänger sind. Die bei diesen Patienten auftretenden Malignome sind jedoch meist lymphoretikulären Ursprungs, also Lymphome oder Retikulosarkome, und ihre Entstehung könnte damit auch auf der Basis einer weiteren Abnormität ihres schon defekten Immunsystems erklärt werden. Es impliziert nicht notwendigerweise die Existenz eines immunologischen Überwachungssystems. Auf gleicher Linie liegt die Beobachtung, daß Patienten mit rheumatischer Arthritis nach Behandlung mit Immunsuppressiva keine erhöhte Tumorrates aufweisen. Daraus muß man schließen, daß noch andere nicht-immunologische Faktoren die Tumourprogression beeinflussen. Es gibt mehrere Indizien, die darauf hindeuten, daß das immunologische Abwehrsystem nur bei virusinduzierten Tumoren eine dominierende Rolle spielt. Bei diesen Malignomen scheinen außerdem genetische Faktoren beteiligt zu sein, was durch tumovirologische Befunde erhärtet worden ist. Man nimmt in der Onkogenhypothese sogar an, daß die Gene für die Tumorentstehung in jeder Zelle vorhanden aber unterdrückt sind; gewissermaßen wie eine Zeitbombe, von der man nicht weiß, wann und wo sie explodiert (Todaro und Hübner, 1972). Nach der Provirus-hypothese hingegen wird das Onkogen mit Hilfe eines Virus von einem Organismus auf den anderen übertragen (Temin, 1970). Nach neueren Befunden scheint eine Kombination beider Theorien wahrscheinlich, wobei die Penetranz der Onkogenexpression und ihre Steuerung die

entscheidende Rolle spielen dürfte (Jaenisch et al. 1976).

Eine weitere Ursache für das bösartige Wachstum und die Metastasierung könnte immunologische Toleranz sein. Bei diesem Phänomen handelt es sich nicht um ein generelles Unvermögen, sondern um die Unfähigkeit eines einzelnen Individuums, gegen ein ganz bestimmtes Antigen zu reagieren. Andere Antigene werden dagegen vollkommen normal erkannt. Das klassische Beispiel dafür ist die Fähigkeit jedes normalen Individuums, körpereigene Gewebe zu tolerieren und nicht abzustößen, obwohl zahlreiche Organe eigene zellspezifische Antigene ausbilden. Aus diesem Grund werden auch Autotransplantate nicht abgestoßen. Dasselbe gilt auch für Iso-Transplantation, also Gewebeübertragung von eineiigen Zwillingen oder Inzuchttieren.

Toleranz kann auf Chimärismus beruhen. Darunter versteht man einen Zustand, bei dem einem Tier Zellen eines anderen Individuums injiziert werden und dort aktiv proliferieren. Handelt es sich hierbei um immunkompetente Zellen, z.B. Lymphozyten, so tritt eine immunologische Reaktion der Spenderlymphozyten gegen das Gewebe des Wirtes auf. Handelt es sich dabei um ein neugeborenes Tier, kann es die übertragenen fremden Lymphozyten nicht abstoßen, weil sein eigenes Immunsystem noch nicht funktionstüchtig genug ist. Überlebt der Wirt diese "graft-versus-host" - Reaktion, wird er tolerant gegen die Transplantationsantigene der Donorlymphozyten (Medavar, 1961).

Toleranz kann aber auch ohne Chimärismus auftreten, wenn hohe Antigenmengen in der embryonalen oder perinatalen Periode verabfolgt werden. Sie kann außerdem umso leichter induziert werden, je verwandter die Tierart ist, von der das Antigen stammt. Mit Gewebe von phylogenetisch weiter entfernten Tieren läßt sich nur schwer Toleranz erzeugen. Werden erwachsene Tiere nach Applikation einer sehr großen Antigendosis tolerant, so spricht man von immunologischer Paralyse, dem eigentlichen Überbegriff.

der Toleranz. Es ist durchaus vorstellbar, daß dieses Phänomen beim Tumorwachstum eine Rolle spielt, vor allem wenn durch die ständig zunehmende Zahl an Tumorzellen die Kapazität des Immunsystems überschritten wird.

Die Meinung, daß alle Krebspatienten immunologisch paralysiert seien, ließ sich jedoch nicht bestätigen. Im Gegenteil, man fand, daß viele Patienten über ein völlig intaktes Immunsystem verfügen. Isolierte Lymphozyten solcher Menschen waren ebenso zytotoxisch wie die gesunder Spender. In diesen Fällen stellte sich heraus, daß das Serum dieser Tumorpatienten Faktoren enthielt, die die Wirkung ihrer an sich intakten Lymphozyten blockieren können (Hehlström et al., 1973). Diese sogenannten Blockierfaktoren sind, wie man nachweisen konnte, lösliche, im Blut zirkulierende Tumorantigene oder Antigen-Antikörperkomplexe (Sjögren et al., 1971). Sie lagern sich an die spezifischen Rezeptoren der zytotoxischen Lymphozyten und blockieren dadurch deren Funktion (Abb. 4.5).

Schließlich können auch die Makrophagen in ihrer Funktion gestört sein. Das erscheint besonders bedeutsam, seit man weiß, daß sie die Kapazität besitzen, das Wachstum neoplastischer Zellen zu regulieren (Normann et al., 1977). Umgekehrt beeinflussen Tumorzellen die Wanderung der Makrophagen zum Ort ihrer Wirkung und reduzieren ihre Anhäufung am Entzündungsherd. An der Hemmung der Makrophagenwanderung dürften bestimmte Mediatoren beteiligt sein, die in vivo wie in vitro nachgewiesen werden konnten (Pike und Snyderman, 1976). Sie werden wahrscheinlich von der Tumorzelle selbst produziert. Einer davon, der Makrophagen-inhibierende Faktor, der die Makrophagen in ihrer Bewegung stört, scheint eine der wichtigsten Waffen der Tumorzelle zu sein, die Immunabwehr auszuschalten. Nach neueren Untersuchungen entsteht die Makrophagenhemmung allerdings erst in einem

relativ spätem Tumorstadium, wenn bereits große Mengen an Krebszellen gebildet worden sind (Normann et al., 1977).

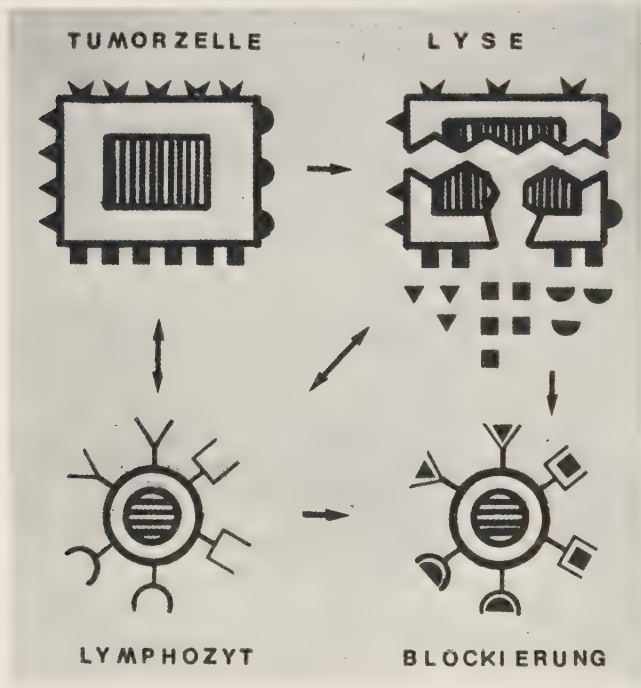


Abb. 4.5: Wirkungsprinzip der Blockierfaktoren

Tumorantigene werden von der Krebszelle freigesetzt und assoziieren sich mit ihren spezifischen Rezeptoren an den zytotoxischen Lymphozyten. Dadurch blockieren sie deren Funktion. Die freigesetzten Antigene induzieren außerdem die Synthese von Antikörpern, die sich an die Antigene der Tumorzellmembran anlagern und dadurch gewissermaßen verdecken. Die auf die Tumorantigene spezialisierten Lymphozyten können, obwohl sie funktionell intakt sind, die Tumorzelle als solche nicht mehr erkennen und damit auch nicht zerstören.

Im Tierexperiment findet man bei einer geringen Tumormasse, die dem präklinischen Stadium menschlicher Karzinome entsprechen würde, eine ganz normale Makrophagenaktivität. Der Makrophagendefekt allein erklärt auch nicht das progressive Wachstum einer Geschwulst, denn auch bei einem Überschuß an tumorsensibilisierten Makrophagen findet man das Fortschreiten eines Tumors (Berd und Prehn, 1977). Erwähnenswert in dieser Hinsicht ist die Beobachtung, daß der Makrophagendefekt verschwindet, sobald der Primärtumor chirurgisch entfernt worden ist. Der Mangel an einwandernden Makrophagen, pathologisch an der Entzündungsreaktion erkennbar, scheint eher auf dem Fortschreiten als auf der spontanen Entstehung einer Krebsgeschwulst zu beruhen.

Diese Beobachtung wirft die Frage auf, ob das Phänomen der Makrophagenhemmung überhaupt eine biologische Relevanz hat, wenn sie nichts mit der Tumorentstehung zu tun hat. Es scheint eher so, als ob die Makrophagen bei der Metastasierung eine wichtigere Rolle spielen, da gezeigt werden konnte, daß sich die Zahl der in den Tumor eingewanderten Makrophagen umgekehrt proportional verhält wie die Metastasierungstendenz (Eccles und Alexander, 1974; Wood und Gillespie, 1975).

Nachdem von mehreren Forschern behauptet wird, daß der Primärtumor in den seltensten Fällen die Zerstörung des Organismus verursacht, sondern daß Metastasen den Tod des Individuums bewirken, sollte man die zwei wesentlichen Stadien des Tumorstadiums - Zytostase und Metastase - miteinander vergleichen. Welche immunologischen Vorgänge spielen in dem einen, welche in dem anderen Stadium eine Rolle? Am besten lassen sich die Zusammenhänge graphisch veranschaulichen (Abb. 4.6), wobei Tumorzellzahl und Tumorstadium zu den Immunreaktionen in Beziehung gesetzt werden.

Die neoplastische Zelltransformation und die anfängliche Vermehrung einzelner Tumorzellen stehen am Beginn der Zytostase.

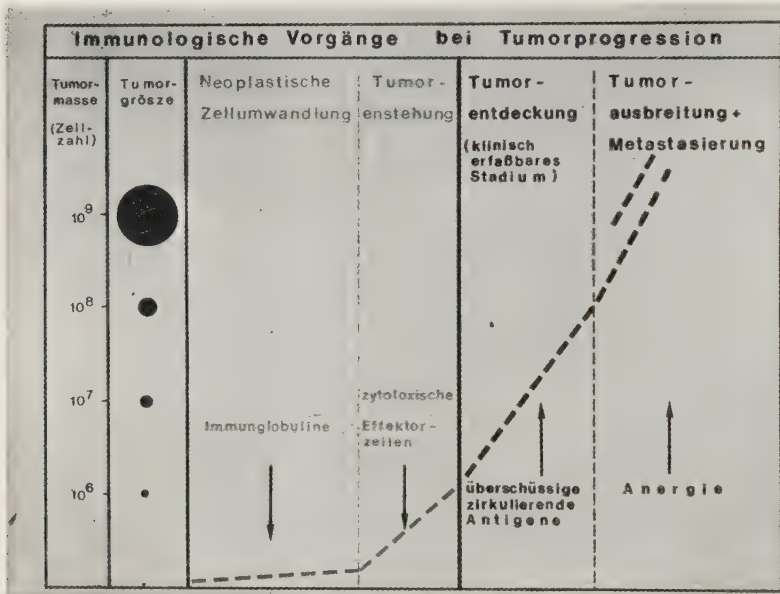


Abb. 4.6: Immunologische Vorgänge während des Tumorwachstums. Tumormasse und Tumorprogression lassen sich zu den jeweilig vorherrschenden Immunreaktionen in Beziehung setzen. Am Beginn der Zytostase (grüner Bereich) steht die neoplastische Zelltransformation, die mit der Synthese spezifischer Immunglobuline beantwortet wird. Wenn sich die Tumorzellen auf ein für den Organismus registrierbares Maß vermehren, treten die zytotoxischen Effektorzellen in Aktion. Erst wenn deren Kapazität durch die zunehmende Zahl an Krebszellen erschöpft ist, kommt es zur Tumorprogression. In diesem Stadium lassen sich die meisten Tumoren klinisch erfassen (roter Bereich). Immunologisch ist diese Phase durch überschüssige zirkulierende Antigene gekennzeichnet, die durch den Tumorzellzerfall entstanden sind. Der zunächst gleitende Übergang von Allergie zu Anergie verschiebt sich immer mehr in Richtung der immunologischen Reaktionslosigkeit. Parallel mit der Zunahme der Anergie kommt es zur Ausbreitung des Tumors und zur Metastasierung.

Immunologisch treten als erste die K-Zellen in Aktion und die B-Lymphozyten, die spezifische Immunglobuline synthetisieren. Mit zunehmender Vermehrung der Tumorzellen werden die zytotoxischen Effektorzellen aufgebraucht. Das zelluläre Immunsystem besitzt also nur eine begrenzte Kapazität. Sie läßt sich aus der Gesamtlymphozytenzahl abschätzen. Die gesamten Lymphozyten eines normalen Organismus können etwa 1 Million Tumorzellen neutralisieren. Volumenmäßig entspricht dies einem Stecknadelkopf. Tumoren dieser Größe sind aber selbst mit den heutigen enorm verfeinerten Diagnostik-Methoden nur sehr schwer zu entdecken. Je nach Technik und Lokalisation gelingt es heute, Tumoren mit einer Zellzahl von 100 Millionen zu diagnostizieren. In diesem Stadium hat der Tumor die verschiedenen Immunbarrieren bereits durchbrochen. Immunologisch ist dies durch das Auftreten überschüssiger zirkulierender Tumorantigene und Blockierfaktoren gekennzeichnet. Die normalen immunologischen Reaktionen stehen still. Die immunologische Homöostase verschiebt sich in Richtung Anergie. Als Folge tritt progressives Tumorstadium und Metastasierung ein.

4.3. Die Regulation des Immunsystems

Aus den bisher diskutierten Befunden geht eindeutig hervor, daß ein immunologisches Überwachungssystem existiert und daß es für das Überleben eines Säugetierorganismus von entscheidender Bedeutung ist. Es ist auch erwiesen, daß es sich während des Wachstums eines malignen Tumors verändert. Jedes System, das sich verändern kann, muß einer Regulation unterliegen. Man kann daher auch bezüglich des Immunsystems die Frage stellen: Wie werden die komplexen immunologischen Reaktionen eigentlich gesteuert? Welche Möglichkeiten der Regulation sind vorstellbar, welche gibt es tatsächlich? Experimentelle Evidenz gibt es bisher für 3 teilweise ineinander übergehende Regulationsmechanismen:

1. die Antigen-abhängige Regulation (Jerne, 1975),
2. die Antigen-unabhängige Regulation und
3. die genetische Steuerung.

Die Antigen-abhängige Regulation erfolgt über T-Lymphozyten mit aktivierender und unterdrückender Wirkung. Die aktivierenden T-Lymphozyten werden als "Helper"-Zellen, die unterdrückenden als "Suppressor"-Zellen bezeichnet. Die Helper-Zellen sezernieren Antigen-spezifische Faktoren, welche die Kooperation mit den B-Lymphozyten vermitteln, wodurch die Antikörperproduktion gesteuert wird. Antagonistische Substanzen werden von den Suppressor-Zellen gebildet, die imstande sind, die Aktivität der B- und T-Lymphozyten zu unterdrücken. Über die Natur dieser Stoffe ist wenig bekannt, es deutet jedoch einiges daraufhin, daß es sich dabei um Makromoleküle, also Proteine oder Nukleinsäuren handeln könnte (Hadden, 1977).

Die Antigen-unabhängige Regulation der Immunantwort wird durch die Antikörper induziert, die in zweifacher Weise wirksam werden können; einerseits durch eine Rückkoppelungskontrolle, andererseits durch die Bildung sogenannter anti-idiotypischer Immunglobuline. Den ersten Fall beobachtet

man, wenn Antikörper passiv verabreicht werden. Es kommt dabei zu einer Hemmung der Immunglobulinsynthese der B-Lymphozyten. Das bedeutet indirekt, daß ab einer bestimmten Antikörperkonzentration deren weitere Synthese unterdrückt wird, weitgehend analog dem Rückkoppelungsmechanismus enzymatischer Reaktionen, den man in diesem Fall als Produkthemmung bezeichnet. Als klassisches Beispiel dafür kann die Cortisontherapie angesehen werden. Wird Cortison exogen zugeführt, stellt der Organismus über den Regelkreis Hypothalamus - Hypophyse die eigene endogene Cortisonproduktion ein. Ähnlich könnte die Steuerung der Antikörpersynthese ablaufen.

Die Regulation über antiidiotypische Antikörper erfolgt nach einem anderen Prinzip. Ihre Existenz ergab sich aus der Beobachtung, daß Immunglobuline selbst über antigene Determinanten verfügen, die im Bereich der Antigenbindungsstellen lokalisiert sind. Sie können daher auch als Antigene wirken, allerdings erst wenn sich ihre Molekülstruktur irgendwie verändert, so daß sie dem eigenen Organismus als fremd erscheinen. Dies kann einerseits durch Anlagerung fremder Antigene geschehen, andererseits durch proteolytische Abspaltungen, die ebenfalls zu einer Strukturveränderung führen. Die dagegen gebildeten antiidiotypischen Antikörper hemmen ebenfalls die Funktion der B-Lymphozyten (Jerne, 1974) und können dadurch eine Immundefizienz verursachen.

Eine genetische Kontrolle des Immunsystems konnte auch für den menschlichen Organismus nachgewiesen werden (McDevitt, 1972). Es konnte gezeigt werden, daß die Reaktion auf einen antigenen Reiz von autosomal dominanten Genen kontrolliert wird, die an 8 bis 10 Loci sitzen und eng an den Histokompatibilitätssort assoziiert sind. Ihre Expression ist ein noch ungeklärter Mechanismus.

Wie viele physiologische Vorgänge bei höher entwickelten Lebewesen dürften auch die immunologischen Prozesse hormonell und neural beeinflussbar sein. Neuere Befunde zei-

gen, daß die Abwehrreaktionen eines Organismus durch Hormone oder Neurotransmitter verändert werden können (Besedovsky und Sorkin, 1977a,b). Dabei werden einerseits die Rezeptoren der T- und B-Lymphozyten moduliert (Raff, 1976), andererseits beeinflußt der antigene Reiz selbst das endokrine System und dadurch die elektrische Aktivität des Hypothalamus (Besedovsky und Sorkin, 1977b). Das System ist jedoch derart komplex, daß es derzeit schwierig sein dürfte, einen Regulationsdefekt genau zu lokalisieren.

Nachdem das Abwehrsystem damit in seinen wesentlichen Eigenschaften dargestellt ist, sollte die Tumorzelle wieder in den Mittelpunkt der Überlegungen gestellt werden.

Eine Tumorzelle ist molekular- und zellbiologisch durch ihre tumorspezifischen Antigene gekennzeichnet. Die Frage ist, ob diese eine klinische Relevanz besitzen. Anders ausgedrückt, lassen sich tumorspezifische Antigene in der Diagnostik und Therapie maligner Krebserkrankungen einsetzen und wenn ja, wie? Um diese Frage zu beantworten, ist es notwendig, die verschiedenen tumorassoziierten Antigene näher zu charakterisieren.

4.4. Tumorassoziierte Antigene

Zahlreiche tumorassoziierte Antigene sind bisher identifiziert worden. Nach ihrer Lokalisation kann man sie in Zellmembran- und Intrazellulärantigene einteilen (Tab. 2).

Zu den membranassoziierten Antigenen zählen die Neo-(MNA)-Antigene, die onkofetalen Membranantigene (OFMA), die membranassoziierten Tumorantigene (MATA), die Kryptantigene und die Alloantigene (AA). Bei den intrazellulären Antigenen kommt zur Gruppe der Neoantigene (ICNA) und den onkofetalen (OFA) noch die Gruppe der Nukleo-, der Nekrose- und der Pseudotumorantigene. In diese Einteilung lassen sich alle bisher entdeckten Antigene neoplastischer Zellen einordnen.

Die Zahl menschlicher Neoplasien, in denen tumorassoziierte Antigene nachgewiesen worden sind, nimmt ständig zu. Die wichtigsten von ihnen sind in Tabelle 3 zusammengefaßt. Dazu gehören auch die in dieser Arbeit untersuchten wie Melanom, Gliom und Nierenkarzinom.

Herkunft und Entstehungsmechanismus dieser Antigene sind noch unklar, doch kommen im wesentlichen 3 Möglichkeiten in Frage:

1. Das Gen für das neue Antigen ist auch in der normalen nicht-transformierten Zelle vorhanden. Seine Expression ist jedoch unterdrückt.
2. Das Gen für das neue tumorspezifische Makromolekül gelangt erst zu einem bestimmten Zeitpunkt in die Zelle, und die Synthese der neuen Genprodukte bewirkt die Umwandlung der Zelle.
3. Normale Zellantigene werden durch bestimmte Vorgänge wie fehlende Glykosilierung oder Proteaseabbau verändert. Wird ein Membranprotein durch das Fehlen einer Glykosyltransferase nicht mit seinem sonst vorhandenen Kohlenhydratanteil verbunden, ändern sich verständlicherweise seine antigenen Eigenschaften. Es wirkt wie ein Neoantigen, obwohl der Proteinanteil durchaus identisch sein kann.

Tab. 2 : TUMORASSOZIIERTE ANTIGENE

1. M E M B R A N A N T I G E N E
 - 1.1. N e o a n t i g e n e (MNA)
 - 1.1.1. Tumorspezifische Transplantations-Antigene (TSTA)
chemisch induzierter Tumoren
 - 1.1.2. TSTA physikalisch induzierter Tumoren
 - 1.2. O n k o f e t a l e M e m b r a n a n t i g e n e (OFMA)
 - 1.2.1. OFMA chemisch induzierter Tumoren
 - 1.2.2. OFMA virusinduzierter Tumoren
 - 1.3. M e m b r a n a s s o z i i e r t e T u m o r -
a n t i g e n e (MATA)
 - 1.3.1. MATA virusinduzierter Tumoren
 - 1.4. k r y p t a n t i g e n e
 - 1.4.1. A-like Antigen
 - 1.4.2. Forssman Antigen
 - 1.4.3. Rezeptor für Concanavalin A
 - 1.4.4. Rezeptor für Weizenkeimlipase
 - 1.5. A l l o a n t i g e n e (AA)
 - 1.5.1. Humane Lymphozyten-Antigene (HLA)
 - 1.5.2. Humane Blutgruppenantigene
2. I N T R A Z E L L U L Ä R E A N T I G E N E
 - 2.1. N e o a n t i g e n e (ICNA)
 - 2.1.1. ICNA DNA-Virus-induzierter Tumoren
 - 2.1.2. ICNA RNA-Virus-induzierter Tumoren
 - 2.2. O n k o f e t a l e A n t i g e n e (OFA)
 - 2.2.1. α -Fetoprotein
 - 2.2.2. α ₂-H-Fetoprotein
 - 2.2.3. Carcinoembryonales Antigen (CEA)
 - 2.2.4. γ -Fetoprotein
 - 2.2.5. Brain-Oncofetales Antigen (BOFAG)
 - 2.2.6. Thymus-Leukämie Fetoprotein (TLFP)
 - 2.2.7. Fetales Sulfoglykoprotein
 - 2.2.8. Fetale alkalische Phosphatase
 - 2.3. N u k l e o a n t i g e n e
 - 2.3.1. Intranukleäre Antigene
 - 2.3.2. Nukleomembranantigene
 - 2.4. N e k r o s e a n t i g e n e
 - 2.5. P s e u d o t u m o r a n t i g e n e

Tab. 3: HUMANE TUMOREN MIT NACHGEWIESENEN TUMOR-
ASSOZIIERTEN ANTIGENEN

1. Bronchialkarzinom	Hollinshead et al. (1974) Watson et al. (1975) Viza et al. (1976) Lopez et al. (1977)
2. Blasenkarzinom	Herr (1976)
3. Chorionepitheliom	Thomson et al. (1978)
4. Glioblastom	Coakham (1974); Birkmayer (1977)
5. Kolonkarzinom	Gold und Freeman (1965)
6. Leberzellkarzinom	Tatarinov (1964)
7. Leukämie	Metzgar und Mohanakumar (1978)
8. Lymphome	Springer et al. (1977)
9. Magenkarzinom	Edgington et al. 1975)
10. Mammakarzinom	Mesa-Tejada et al. (1978)
11. Melanom	Smalley und Bystryn (1978)
12. Neuroblastom	Götz (1972)
13. Nierenkarzinom	Faulconer et al. (1978)
14. Osteosarkom	Eilber und Morton (1976)
15. Ovarialkarzinom	Anon (1978)
16. Pankreaskarzinom	Mihás (1978)
17. Pharynxkarzinom	Suzuki (1978)
18. Prostatakarzinom	Brannen et al. (1975)
19. Schilddrüsenkarzinom	Rochman et al. (1975)
20. Teratom	Ostrand-Rosenberg et al. (1977)

Es ist auch festgestellt worden, daß Tumorzellen vermehrt Proteasen oder Glykosidasen sezernieren, die vor allem die an der Zelloberfläche lokalisierten Proteine oder Glykoproteine verändern können. Ein bekanntes Beispiel ist die Neuraminidasebehandlung von Zellen, wodurch neue Antigenstrukturen entstehen.

Als Beispiel für die erste Möglichkeit, daß ein Gen reprimiert ist, gelten die embryonalen Antigene, sowie die tumorspezifischen Transplantationsantigene. Es ist durchaus berechtigt anzunehmen, daß embryonale Proteine auch nach abgeschlossener Differenzierung wieder gebildet werden können, denn das Gen ist immer vorhanden. In der postembryonalen Phase wird es jedoch durch einen ganz bestimmten Repressor blockiert, der seine phänotypische Expression verhindert. Wird dieser Repressor durch exogene oder endogene Einflüsse inaktiviert, kann es durch Transkription und Translation des betreffenden Genes zur Neusynthese eines embryonalen Antigens auch in der postembryonalen Phase kommen. Durch diesen Derepressionsvorgang und der damit verbundenen Synthese embryonaler Proteine kann die Zelle wieder in einen weniger differenzierten Zustand kommen, der sich klinisch-pathologisch als niederdifferenziertes Karzinom oder Sarkom manifestiert. Die Wahrscheinlichkeit, in solchen Tumoren onkofetale Antigene zu finden, ist groß.

Wie allgemein bekannt ist, gibt es jedoch auch hochdifferenzierte Neoplasien, die sich bezüglich Struktur und Funktionsmerkmale kaum von einer Normalzelle unterscheiden. In diesen Fällen wird die Diagnose "Karzinom" auf Grund bestimmter Zusammenhänge wie Kernatypien, veränderte Kern - Plasma - Relation, Mitosereichtum und infiltratives Wachstum gestellt. Eine Einzelzelle kann jedoch mit den üblichen Methoden nicht sicher als Krebszelle angesprochen werden. Trotzdem steckt in der Zelle das ganze Potential einer neoplastischen Geschwulst mit all ihren Eigenschaften. Man kann daraus den Schluß ziehen, daß es bestimmte Makromole-

küle, also Proteine, Glykoproteine oder Lipoproteine, geben muß, die für die Entstehung und Aufrechterhaltung des transformierten Zustandes notwendig sind. Der definitive Beweis solcher Transformierproteine ist bis dato noch nicht gelungen. Es gibt jedoch indirekte genetische und biologische Evidenz für deren Existenz (Glick, 1976). Ihre eindeutige Charakterisierung ist deshalb schwierig, weil es bisher keinen biochemischen Test gibt, mit dem die Zelltransformation nachgewiesen werden könnte. Nur mit Hilfe onkogener RNA-Viren gelingt es, die Synthese und die Funktion dieser Transformierproteine zu verfolgen. Transformationsdefekten Mutanten dieser Viren fehlt ein Gen, das die Bezeichnung "sarc-Gen" oder "Sarkom-Gen" trägt und das offensichtlich für die Entstehung einer transformierten Zelle notwendig ist. Das Produkt dieses Sarkom-Genes ist ein Protein (Weiss, 1977; Khan et al., 1978), möglicherweise auch mehrere niedermolekulare Proteine (Kamine et al., 1978). Ihre Funktionen sind jedoch noch nicht aufgeklärt. Rätselhaft ist auch, warum sich dieses Gen gerade in Viren findet, bei denen kein teleologischer Grund für die Notwendigkeit vorliegt, denn vermehren können sich diese Viren auch ohne Sarkom-Gen. Identische Replikation ist jedoch der eigentliche Selbstzweck jeder, auch der kleinsten biologischen Einheit (Monod, 1971). Es läßt sich darüber nur spekulieren. Denkbar wäre, daß diese RNA-Viren im Laufe der vielen Generationen ihrer intrazellulären Replikation ein zelluläres Gen in ihr Genom integriert und damit aus der Zelle herausgeschleust haben. Mit dem gleichen Mechanismus einer Virusinfektion können diese RNA-Viren das Gen auch wieder in die Zelle schmuggeln; daß es zufälligerweise gerade jenes Gen ist, das für die Zellumwandlung oder für die Differenzierung verantwortlich ist, könnte unter anderem statistisch erklärt werden. Was RNA-Viren in vivo durchführen können, konnte in der Zwischenzeit auch in vitro reproduziert werden. Es gelingt unter bestimmten Bedingungen, ein Gen aus der chromosomalen DNA des einen Organismus herauszu-

holen und es in die eines anderen Organismus zu implantieren. Dafür hat sich das Schlagwort "genetische Manipulation" eingebürgert. Betrachtet man die Funktion dieser Transformierproteine, so ist einleuchtend, daß sie in allen Tumoren vorkommen sollten. Deshalb ist es eher unwahrscheinlich, daß es sich bei ihnen um onkofetale Antigene handelt; ebenso wenig um Kryptoantigene, die durch Enzymeinwirkung (Neuraminidase) entstehen.

Der Nachweis eines allgemein tumorspezifischen Antigens mit den Eigenschaften eines Transformierproteins wäre ein entscheidender Fortschritt in der Tumorummunologie. Er würde die Basis für einen allgemeinen "Krebstest" darstellen und damit die Ansatzpunkte für eine rationale Immuntherapie bieten.

Erste Ergebnisse in dieser Richtung sind vor kurzem veröffentlicht worden. Es sind Befunde erhoben worden, die für die Existenz eines allgemein tumorspezifischen Antigens sprechen (Dickinson, 1977; Budzynski und Radzikowski, 1977). Dabei handelt es sich um ein niedermolekulares basisches Oberflächenprotein (Kast, 1977a). Es wurde mit dem humanen Choriogonadotropin (HCG) in Zusammenhang gebracht.

Ein weiteres allgemein tumorassoziiertes Antigen (ATAA) wird mit dem enzephalitogenen Protein, einem basischen Protein der Myelinfraktion, in Beziehung gesetzt (Jensen et al., 1977).

In dieser Richtung können auch eigene Beobachtungen gedeutet werden, daß Antigenpräparationen von menschlichen Gliomen nach Applikation in Kaninchen zu Enzephalitiden und schließlich zum Tod der Tiere geführt haben (Birkmayer, unveröffentlichte Versuche).

Auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bieten einige Anhaltspunkte, daß zumindestens bestimmte menschliche Malignome ein oder mehrere gemeinsame Antigene besitzen. Elektrophoretische Analysen geben Hinweise, daß eines dieser Antigene ein niedermolekulares, möglicherweise basisches, Protein ist. Inwieweit es mit dem Choriogonadotropin ver-

wandt ist, muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben. Ein weiteres, in diesen Experimenten identifiziertes tumor-assoziiertes Antigen hat auf Grund seiner elektrophoretischen Eigenschaften ein Molekulargewicht von etwa 70.000 dalton. Seine Reindarstellung und Charakterisierung ist derzeit im Gange.

Als Bestätigung und Erweiterung der eigenen Ergebnisse können die ausgedehnten Untersuchungen einer amerikanischen Gruppe angesehen werden. In diesen Experimenten konnte gezeigt werden, daß Membranextrakte von verschiedenen Karzinomen und Sarkomen Kreuzreaktion mit Seren verschiedener Karzinomträger zeigten. Dies war in 90% der untersuchten Seren der Fall, während Seren sogenannter gesunder Patienten nur in 25% der Fälle mit den Tumormembranextrakten reagierten (Gupta und Morton, 1978). Die Präsenz kreuzreagierender Antikörper in einem bestimmten Prozentsatz der Normalseren darf nicht überbewertet werden. Zum einen könnte es sich um ein präklinisches Tumorstadium handeln, zum anderen könnten die Probanden mit dem positiven Serum Antikörper gegen Tumorantigene produzieren, weil bei ihnen ein maligner Prozeß abgelaufen ist, mit dem sie aber auf Grund ihrer kompetenten Immunabwehr fertig geworden sind.

Die Identifizierung und Charakterisierung eines allgemein tumorspezifischen Antigens brächte für die Tumorummunologie und vor allem für die Diagnostik und Therapie menschlicher Malignome wesentliche Fortschritte. Dieses allgemein tumorspezifische Antigen (ATA) könnte zur Gewinnung nicht-kreuzreagierender spezifischer Antikörper verwendet werden (Kast, 1977b). Nach radioaktiver Markierung dieser Antikörper könnten sie unter Verwendung eines dreidimensionalen "Scanners" zur Lokalisation des Primärtumors und eventuell vorhandenen Metastasen herangezogen werden. Diese Befunde würden die Operationsindikation und Modalität entscheidend beeinflussen. Bei inoperablen Tumoren könnten die Antikörper nach besonders heißer Markierung als Radiotherapeutika

eingesetzt werden.

Der Nachweis eines allgemeinen tumorspezifischen Antigens bzw. eines dagegen gerichteten Antikörpers würde bedeuten, daß ein neoplastischer Prozeß irgendwo im Organismus abläuft. Er würde jedoch primär keine organische Zuordnung erlauben.

Dazu wäre es außerdem notwendig, Karzinom-spezifische Antigene zur Verfügung zu haben. Mit einem reinen, für Gliome oder Melanome oder Nierenkarzinom spezifischem Antigen könnte auch diese Frage beantwortet werden.

Wie aus Tabelle 3 hervorgeht, gibt es eine Reihe von menschlichen Tumoren, in denen tumorspezifische Antigene nachgewiesen werden konnten. Um diese jedoch zu diagnostischen Zwecken nutzbar zu machen, müßten sie in reinsten Form vorliegen; erstens um Artefakte auszuschalten und zweitens um einen monospezifischen Antikörper dagegen produzieren zu können. In dieser Richtung laufen Untersuchungen von zahlreichen Gruppen im In- und Ausland.

Für die klinische Anwendbarkeit, vor allem in der Diagnostik, haben die Experimente der vorliegenden Arbeit auch einige Grundlagen geliefert. Mit tumorspezifischen Membrankomponenten konnten im Serum von Gliom- und von Melanompatienten kreuzreagierende Antikörper nachgewiesen werden, die zur Untermauerung der klinischen Diagnose in mehreren Fällen herangezogen wurden. Alle bisher untersuchten Kontrollseren waren dagegen negativ.

Negative Ergebnisse werfen jedoch immer die Frage auf: Wie empfindlich ist die angewandte Methode? Welche Mengen lassen sich damit noch nachweisen? Es erscheint deshalb sinnvoll, die einzelnen Methoden, die man zur Ermittlung der zellulären und humoralen Immunantwort zur Verfügung hat, bezüglich ihrer Spezifität und Sensitivität genauer zu beleuchten. Die Gesamtheit dieser Tests erlaubt die Ermittlung eines Immunstatus, der Auskunft über die Funktionstüchtigkeit des Immunsystems gibt.

4.5. Immunstatus

Die wichtigsten Parameter zur Ermittlung eines Immunstatus sind nach generellen, zellulären und humoralen Tests zusammengefaßt (Tab. 4). Zu den generellen Parametern zählen die absolute Lymphozytenzahl, die Immunglobulinkonzentration, die Komplementbestimmung und der Nachweis immunkompetenter Lymphozyten und Makrophagen. Obwohl diese Parameter rasch und leicht zu ermitteln sind, ist ihre Spezifität gleich null, da sie auch bei Infektionen oder einer chronischen System- oder Autoimmunerkrankung verändert sein können.

Zur Beurteilung der zellulären Immunkomponenten bieten sich vor allem folgende Tests an: Zytotoxizität, Lymphozytentransformation, Makrophagenmigrationshemmung, Leukozytenadhärenzhemmung sowie intrakutane Sensibilitätsprüfung. Diese Methoden sind sehr spezifisch, wenn Tumorzellen verwendet werden. Diese sind jedoch nur postoperativ oder nach in vitro-Kultur verfügbar, was die Praktikabilität und damit den klinischen Einsatz stark einschränkt. Zur Abklärung der Funktionstüchtigkeit des zellulären Abwehrsystems sind sie jedoch unbedingt notwendig. Defekte der T- und B-Lymphozyten sowie der Makrophagen können nur mit diesen relativ aufwendigen Methoden abgeklärt werden.

Zur Ermittlung der Kapazität der humoralen Immunkomponenten kommt vor allem der Nachweis spezifischer Antigene, dagegen gerichteter Antikörper und der Lymphokine in Frage. Die wichtigste Voraussetzung für eine Spezifität ist die Verwendung eines tumorassoziierten Antigens, das frei von Verunreinigungen ist. Auch ein dagegen gerichteter monospezifischer Antikörper garantiert Tumorspezifität. Ist die Bedingung der Spezifität erfüllt, interessiert den klinischen Diagnostiker vor allem die Praktikabilität, die sich aus Geschwindigkeit des Tests und seiner qualitativen wie quantitativen Auswertbarkeit ergibt.

Tab. 4: PARAMETER DES IMMUNSTATUS

	Tumor- spezifität	Praktika- bilität
1. GENERELLE PARAMETER		
1.1. Absolute Lymphozytenzahl	0	1 (a)
1.2. Immunglobulin-Konzentration	0	1
1.3. Komplementbestimmung	0	1
1.4. Nachweis immunkompetenter Zellen	0	1
1.5. Makrophagenfunktion	0	1
2. ZELLULÄRES SYSTEM		
2.1. Zytotoxizitätstest	1	0
2.2. Lymphozytentransformation	1	0
2.3. Makrophagen-Migrations- hemmung (MIF)	1	1
2.4. Leukozyten-Adhärenz- inhibierung (LAI)	1	1
2.5. Intrakutane Hauttests	0	1
3. HUMORALES SYSTEM		
3.1. Nachweis spezifischer Anti- gene oder Nachweis spezi- fischer Antikörper mit		
3.1.1. Immundiffusion	1	1
3.1.2. Immunelektrophorese	1	1
3.1.3. Gegenstromelektrophorese	1	1
3.1.4. Komplementbindungsreaktion (KBR)	1	0
3.1.5. Hämagglutination	1	0
3.1.6. Immunfluoreszenz	1	0
3.1.7. Enzymimmuntest	1	1
3.1.8. Radioimmuntest	1	1
3.2. Nachweis von Lymphokinen	0	0
3.3. Nachweis von Immun-RNA	1	0

(a) In der digitalen Schreibweise bedeutet 1 = positiv
0 = negativ

Die in Tabelle 4 unter 3.1. zusammengefaßten Methoden sind der Empfindlichkeit nach geordnet, wobei der Radioimmuntest am empfindlichsten ist. Bezüglich rascher Durchführbarkeit und Dauer des Tests liegen die Gegenstromelektrophorese, die Hämagglutination und der Enzymimmuntest an der Spitze, dagegen sind die Immundiffusion, die Immunfluoreszenz und der Radioimmuntest wesentlich zeitraubender, wenn sie auch eine gute qualitative wie quantitative Analyse erlauben.

Die Empfindlichkeit der Immundoppeldiffusion ist unter anderem abhängig von der Anfärbbbarkeit durch Proteinfarbstoffe. Mit den bisher empfindlichsten Reagenzien lassen sich derzeit 0.5 bis 1 μ g Protein nachweisen. Bei Verwendung radioaktiv-markierter Antigene oder Antikörper läßt sich dieser Test zu einer Radioimmunpräzipitation modifizieren, der wesentlich empfindlicher ist.

Mit Hilfe der Gegenstromelektrophorese kann noch ein Zehntel der obigen Proteinmenge nachgewiesen werden, also etwa 0.05 μ g Protein. Der Radioimmuntest ist je nach Bedingungen etwa 1000fach empfindlicher als der Immundoppeldiffusionstest. Klinische Verwendung findet er bereits zum Nachweis des Alphafetoproteins und des carcinoembryonalen Antigens, der zur Untermauerung der Diagnose eines Dickdarmkarzinoms bzw. eines primären Leberzellkarzinoms herangezogen wird. Dazu wäre zu bemerken, daß es sich bei diesen Antigenen um intrazelluläre Proteine handelt, gegen die der Organismus erst zu einem relativ späten Zeitpunkt Antikörper bildet, nämlich dann, wenn Tumorzellen zerfallen. Die frühesten Antikörper werden gegen die Membranproteine gebildet. Ihr Nachweis würde die Diagnose eines Malignoms daher zu einem früheren Zeitpunkt gestatten. Unter dieser Prämisse ist deshalb auch versucht worden, Membranantigene aus Melanom, Gliom und Nierenkarzinom zu isolieren.

Bewertet man die Parameter des Immunstatus außerdem bezüglich ihrer Tumorspezifität und ihrer Praktikabilität z.B. in Form einer digitalen Beurteilung (0 = negativ, 1 = posi-

tiv), so kann auf die klinische Relevanz der einzelnen Methoden rückgeschlossen werden. Demnach sind für das zelluläre System der Zytotoxizitätstest und für das humorale System der Radioimmunttest und die Gegenstromelektrophorese die relevantesten Methoden.

Hat man mit Hilfe eines kompletten Immunstatus die Defekte des Abwehrsystems ermittelt und läßt die Präsenz tumorspezifischer Antikörper im Patientenserum auf das Vorliegen eines Malignoms schließen, kommt das für den Kliniker entscheidende Problem: Wie kann man diese Defekte beheben? Anders ausgedrückt: Kann man einem Krebsgeschehen immunologisch entgegenwirken, und wenn ja, wie?

Die erste Frage läßt sich mit einem klaren Ja beantworten. Es gibt zahlreiche Beispiele, daß sich maligne Tumoren von selbst zurückbilden, z.B. das maligne Melanom. Außerdem findet man bei Obduktionen gelegentlich verkalkte Tumorherde, die dafür sprechen, daß es dem Organismus gelungen ist, dem malignen Prozeß Einhalt zu gebieten. Schließlich beobachtete man, daß Lungenmetastasen bei Nierenkarzinompatienten nach Tumornephrektomie in einigen Fällen verschwanden. Konkret gesprochen heißt dies, daß es Mittel und Wege gibt, bösartiges Wachstum zu unterdrücken. Offensichtlich spielen sich dabei physiologische Phänomene ab, die bei den meisten Patienten gestört sind. Wenn es gelingt, diese Phänomene zu simulieren, hätte man die Basis für eine rationale Immuntherapie in der Hand.

Obwohl diese Immunphänomene noch nicht vollkommen ent-rätselt sind, hat man vor allem auf Grund der meist infau-sten Prognose bei malignen Tumoren versucht, das Immunsystem der Patienten zu stimulieren. Für diese Immunstimulation hat sich der Begriff "Immuntherapie" eingebürgert.

4.6. Immuntherapie

Allen immuntherapeutischen Konzepten liegt die Logik zu Grunde, das Abwehr- und Überwachungssystem zu stimulieren oder seine Defekte durch Supplementierung zu beheben. Unter Stimulation wird im weitesten Sinne die aktive Immunisierung verstanden, unter Supplementierung die passive Immunisierung.

Bei aktiver Immunisierung kann man wieder unterscheiden zwischen unspezifischer und spezifischer Stimulation (Tab. 5). Die meisten der bisher durchgeführten klinischen Studien basierten auf einer nichtspezifischen Anregung des Immunsystems durch Bakterien oder Viren. Am weitaus häufigsten wurde dabei BCG (*Bacillus Calmette Guerin*) verwendet. Eine Modifikation dieser Modalität ist der Gebrauch von MER (= Methanol-extrahierter Rest von BCG). Daneben wurden auch noch attenuierte Erreger von Diphtherie und Keuchhusten als Immunstimulans eingesetzt. Schließlich hat man beobachtet, daß Interferon-induzierende Substanzen wie Poly-IC (Beers und Braun, 1971; Schultz et al., 1977) oder bestimmte Phytotherapeutika wie Esberitox^R (Pohl, 1969) imstande sind, die Immunfunktionen, allen voran die zellulären, wieder zu re-staurieren. Hier bedarf es noch ausgedehnter Studien, den Wirkungsmechanismus dieser Substanzen aufzuklären.

Die spezifisch wirkenden Immunstimulantien wirken über eine Aktivierung der T- und B-Lymphozyten sowie der Makrophagen. Dies ist zunächst mit autologen Tumorzellen versucht worden, wobei diese entweder durch Formalin oder Glutaraldehyd abgetötet wurden. Gelegentlich wurden auch bestrahlte Tumorzellen eingesetzt. Schließlich wurde versucht, die Tumorzellantigenität durch Neuraminidaseeinwirkung zu erhöhen, um dadurch den Effekt der Immunstimulation zu erhöhen. Ebenso hat man versucht, Tumorzelleextrakte - und soweit verfügbar - reine Tumorzellmembranantigene einzusetzen. Kontrollierte und reproduzierbare klinische Studien

sind damit jedoch bisher nicht unternommen worden.

Tabelle 5:

IMMUNOLOGISCHE KONZEPTE ZUR THERAPIE MALIGNER TUMOREN

1. AKTIVE IMMUNISIERUNG

1.1. NICHTSPEZIFISCHE

- 1.1.1. *Bacillus Calmette Guérin (BCG)*
- 1.1.2. *MER (-Methanol extrahierter Rest von BCG)*
- 1.1.3. *Vakzine von Corynebacterium parvum, Streptococcus oder Bordetella pertussis*
- 1.1.4. *Interferon induzierende Substanzen (z.B. Poly-IC)*

1.2. SPEZIFISCHE

- 1.2.1. *Aktivierung der T-Lymphozyten*
 - 1.2.1.1. *Applikation autologer Tumorzellen*
 - 1.2.1.2. *Applikation alterierter autologer Tumorzellen (nach Röntgenbestrahlung, Neuraminidasebehandlung oder Haptenisierung)*
 - 1.2.1.3. *zellfreies Tumorphomogenat*
 - 1.2.1.4. *Tumorzellmembranantigene*
 - 1.2.1.5. *attenuierte Viren (nur bei virusinduzierten Tumoren)*
 - 1.2.1.6. *Transferfaktor*
 - 1.2.1.7. *Immun-RNA*
- 1.2.2. *Aktivierung der B-Lymphozyten*
 - 1.2.2.1. *B-Lymphozyten stimulierende Faktoren*
- 1.2.3. *Aktivierung der Makrophagen*
 - 1.2.3.1. *Makrophagen sensibilisierende Faktoren*
 - 1.2.3.2. *Makrophagen "armierende" Faktoren*

2. PASSIVE IMMUNISIERUNG

2.1. ZELLULÄRE KOMPONENTEN

- 2.1.1. *Lymphozytentransfusion (GVH!)*
- 2.1.2. *Transfusion allogener Knochenmarkszellen*
- 2.1.3. *Übertragung unspezifisch aktivierter Makrophagen*
- 2.1.4. *Übertragung "armerter" Makrophagen*

2.2. HUMORALE KOMPONENTEN

- 2.2.1. *Applikation zytotoxischer Immunsereen*
- 2.2.2. *Übertragung tumorspezifischer Antikörper*
- 2.2.3. *Übertragung von Komplementfaktoren*
- 2.2.4. *Übertragung von Lymphokinen*
- 2.2.5. *Übertragung von Thymosin*

Bei virusinduzierten Tumoren konnte im Tierexperiment eine aktive Immunisierung mit attenuierten Viren erzielt werden. So gelang es, Mäuse durch Injektion von inaktivierten Leukämieviren gegen diese Erkrankung zu immunisieren (Hunsmann et al., 1975; Huebner et al., 1976). Gleichzeitig konnte ein immunstimulierender Effekt auf die T-Lymphozyten nachgewiesen werden. Daraus kann indirekt geschlossen werden, daß zumindestens ein Teil der Virusproteine in die Zellmembran integriert sein muß und dort vom Immunsystem registriert wird. Bisher sind jedoch nur in wenigen Fällen virale Antigene an der Zelloberfläche identifiziert worden, die als mögliche Immunstimulantien wirken könnten. Deshalb erscheint es sinnvoller, statt eines möglichen humanen Tumovirus isolierte tumorspezifische Zellmembranantigene als Aktivatoren der Immunabwehr einzusetzen.

Auch die Übertragung von Transfer-Faktoren führt zu einer spezifischen Immuninduktion. Bei diesen Transfer-Faktoren handelt es sich um lösliche niedermolekulare Lymphozytenprodukte, die eine Information für die noch nicht-differenzierte Lymphozyten enthalten. Diese Information lautet: Differenziert euch und bildet Rezeptoren gegen die tumorspezifischen Membranantigene aus, damit ihr Zellen, die diese Antigene tragen, vernichten könnt. Erwähnenswert wäre noch, daß Transfer-Faktoren nicht Spezies-spezifisch sind, und demnach könnten auch heterologe Präparationen verwendet werden.

Ein ähnliches Prinzip wird bei der Übertragung von Immun-RNA wirksam (Abb. 4.7). Ein Beispiel soll dies deutlich machen: Pflanzt man einem Schaf einen Mäusetumor ein, so wird das Implantat auf Grund seiner Maus-spezifischen Antigene nach wenigen Tagen abgestoßen. Während dieser Zeit bilden sich im Schaf gegen den Mäusetumor gerichtete Lymphozyten und Makrophagen aus, die die Tumorzellen ebenfalls neutralisieren. Die Makrophagen inhalieren dabei die ganze Tumorzelle und verarbeiten die tumorspezifischen Antigene

in sonderbarer Weise. Es wird eine Nukleinsäure gebildet, die sogenannte Immun-RNA, die inaktive Lymphozyten zur Proliferation und Differenzierung anregen kann. Diese Immun-RNA kann durch Lymphdrainage aus den Schaflymphozyten gewonnen werden.

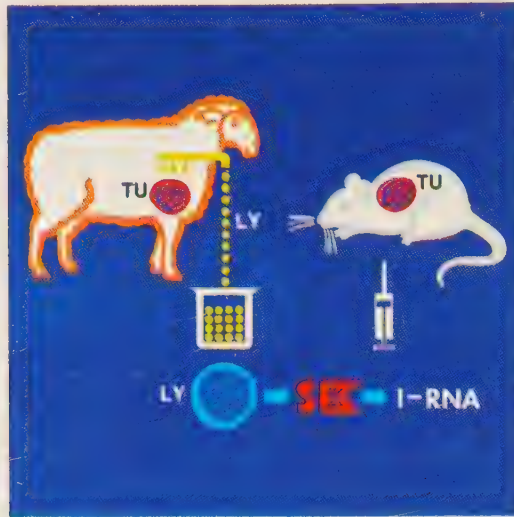


Abb. 4.7: Prinzip der Immun-RNA Gewinnung

Pflanzt man einem Schaf einen Mäusetumor ein, wird das Implantat auf Grund seiner Maus-spezifischen Antigene nach wenigen Tagen abgestoßen. Gleichzeitig bilden sich im Organismus des Schafes gegen den Mäusetumor gerichtete Lymphozyten und Makrophagen. Sie produzieren nach Zerstörung der Mäusetumorzellen eine Nukleinsäure, die sogenannte Immun-RNA, die eine Information für andere noch nicht-differenzierte Lymphozyten auch von denen der Maus enthalten. Sie besagt, daß sich die Lymphozyten in der Weise differenzieren sollen, daß sie die das betreffende Antigen tragende Zelle erkennen und neutralisieren können. Diese Immun-RNA kann durch Lymphdrainage vom Schaf gewonnen werden. Nach Injektion in die Tumor-tragende Maus ist sie imstande, neue immunkompetente Lymphozyten in der Maus zu induzieren, was an der Regression des Tumors festgestellt werden kann.

Nach Injektion in tumorbefallene Mäuse führt sie zu einer Restauration der defekten zellulären, aber auch der humoralen Immunkomponenten. Die Wiederherstellung intakter Immunfunktion

nen ist an der Regression des Tumors zu erkennen. Analoge Versuchsanordnungen sind auch mit einigen menschlichen Karzinomen und Sarkomen erprobt worden. Einige relevante Studien mit Immun-RNA sind in Tab. 5 angeführt.

Versuche mit B-Lymphozyten-stimulierenden Faktoren sind bisher klinisch nicht eingesetzt worden, da bisher zu wenig über diese Faktoren bekannt ist. Ähnliches gilt für die Aktivierung der Makrophagen. Bisher hat man nur nachweisen können, daß sie durch eine Reihe von unspezifischen Substanzen wie Bakterien oder deren Toxine stimuliert werden. Der Effekt von BCG bei der nicht-spezifischen Immuntherapie dürfte darauf beruhen. Eine spezifische Armierung der Makrophagen in vitro ist bisher nicht gelungen.

Die Möglichkeit einer passiven Immunisierung wird dann in Betracht gezogen, wenn ein frühes Tumorstadium vorliegt. Versuche in einem relativ spätem Stadium sind ebenfalls unternommen worden; wahrscheinlich mehr wegen der infausten Prognose als auf Grund rationaler Überlegungen. Theoretisch bieten sich dabei 2 Möglichkeiten an:

1. Übertragung zellulärer Komponenten
2. Übertragung humoraler Faktoren

Bei der Applikation zellulärer Komponenten muß man berücksichtigen, daß eine Abstoßungsreaktion auftritt, wenn man nicht mit autologen Lymphozyten arbeitet. Diese sind jedoch nur dann sinnvoll, wenn sie nachgewiesenermaßen nicht defekt sind. Meist ist dies jedoch der Fall. Sinnvoller erscheint zweifelsohne der Einsatz von Immunseren oder die Übertragung von tumorspezifischen Antikörpern, die aus Rekonvaleszenten-serum gewonnen werden könnten.

Je nach vorhandenen Mängeln könnte man auch Komplementfaktoren, Lymphokine oder Thymosin supplementieren.

Bei jeder Modalität immuntherapeutischen Vorgehens sollte man sich fragen, welche Voraussetzungen erfüllt werden müssen, daß es zur Autolyse der Tumorzellen kommen kann. Das Endziel ist sicherlich die Wiederherstellung der immunologi-

schen Homöostase, was die Restaurierung des zellulären und des humoralen Systems impliziert. Ein bisher noch nicht angesprochenes Problem ist die Kommunikation zwischen Tumorzellen und Immunkomponenten. Obwohl viele Malignome einen gefäßproliferierenden Faktor ausbilden (Folkman, 1975), der an der Ausbildung und Einsprossung neuer Gefäße in den Tumor beteiligt sein soll, sind rasch wachsende Tumoren nutritiv unterversorgt. Daraus resultiert eine partielle Nekrose, die meist zentral am deutlichsten ausgeprägt ist. In diesen nekrotischen Bezirken ist die Kommunikation mit den Komponenten des Immunsystems sicher unterbrochen oder gestört. Inwieweit diese Phänomene für die Schwäche der Immunreaktionen verantwortlich gemacht werden können, bedarf weiterer Abklärung.

Die klinischen Studien zur Immuntherapie menschlicher Karzinome und Sarkome sind zahlreicher, als man auf Grund der beschränkten Kenntnis des Immunstatus annehmen dürfte. Es ist enorm schwierig, die einzelnen Veröffentlichungen darüber zu beurteilen, da sie meist nicht vergleichbar sind. Abgesehen vom Patientengut und der jeweiligen Modalität lassen sich auch analoge Vorgangsweisen und Verfahren schwer objektivieren. Man kann jedoch versuchen, alle Studien nach bestimmten Prinzipien zu beurteilen. 4 Kriterien scheinen dafür besonders geeignet. Sie sind mit abnehmender Wichtigkeit aufgelistet:

1. Therapeutischer Erfolg
2. Kontrollierte Studie
3. Randomisierte Patienten
4. Vergleichende Kontrollen

Setzt man als Ziel jedes Immuntherapieversuches den Erfolg des Experimentes an, lassen sich damit 8 Typen von Studien unterteilen (Tab. 6).

Tabelle 6: Klassifizierung immuntherapeutischer Studien

Kriterien	Typ							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1. Therapeutischer Erfolg	1	1	1	1	1	1	1	1 ^(a)
2. Kontrollierte Studie	1	1	1	1	0	0	0	0
3. Randomisierte Patienten	1	1	0	0	1	0	1	0
4. Vergleichbare Kontrolle	1	0	1	0	1	1	0	0

(a) bei dieser digitalen Schreibweise bedeutet: 1 = positiv
0 = negativ

Nach dieser Klassifizierung sind die wichtigsten bisher veröffentlichten immuntherapeutischen Studien begutachtet worden und nach Tumorart, Modalität und Typ zusammengefaßt (Tab. 7). Die Typnummer läuft parallel mit der Validität der klinischen Studie; die niedrigste Typnummer entspricht qualitativ der besten Studie.

Es würde den Rahmen dieser Abhandlung sprengen, auf die einzelnen Tumorarten gesondert einzugehen. Aus allen Berichten kann folgendes Resümee gezogen werden: Die bisher besten Erfolge immuntherapeutischen Vorgehens sind bei Leukämie und Melanomen beobachtet worden. Bei diesen Erkrankungen liegt nicht nur die längste Erfahrung vor, sondern auch die Remissionsraten und die Erfolgsquoten liegen beträchtlich über denen von anderen Tumoren.

Generell muß festgestellt werden, daß alle bisherigen immuntherapeutischen Studien mit dem Manko eines fehlenden oder inkompletten Immunstatus behaftet waren. Unter diesem Aspekt sind die vielen negativen oder unbefriedigenden Ergebnisse nicht überzubewerten. Sie erlauben auch nicht den Schluß, daß Immuntherapie wirkungslos ist. Dies trifft meist

dann zu, wenn auf Grund falscher Annahmen oder eines fehlenden Immunstatus die falsche Modalität gewählt worden ist. Es ist klar, daß bei Tumorpatienten mit einem Mangel an zytotoxischen Lymphozyten nach Applikation von Tumorzellen keine Remission zu erwarten ist, da die wenigen noch vorhandenen Lymphozyten bereits überfordert sind und danach völlig dekompensieren.

Tabelle 7:

ÜBERBLICK ÜBER DIE BISHER VERÖFFENTLICHEN IMMUNTHERAPEUTISCHEN STUDIEN

TUMORART	MODALITÄT	TYP	AUTOREN
Blasencarcinom	Transfer-Faktor	4	Pizza et al., 1977
	BCG	8	Eidinger&Morales, 1976
Brustkrebs	Coryne p. (Chemoth.)	1	Israel&Edelstein, 1975
	BCG (- " -)	2	Gutterman et al., 1976
	Lasuamisol	2	Rojas et al., 1976
	Coryne p. (Chemoth.)	8	Pinsky et al., 1977
	Transfer-Faktor	8	Oettgen, 1974
Coloncarcinom	BCG	8	Mavligit et al., 1976
	Tumorzell-"Vakzine"	8	Griffen&Meeker, 1972
	Thymus-Faktoren	8	Turouksi et al., 1976
<i>L e u k ä m i e</i>			
A L L (akute lymphatische)	BCG u. allogene Leukämiezellen	1	Mathé, 1969
	- " -	1	Otten, 1977
	Reinfusion autologer Zellen u. Serum	4	Skurkovich et al., 1969
	BCG	8	Kay, 1977
A N L (akute myeloische)	BCG u. Leukämiezellen	1	Powles et al., 1973
	- " -	4	Reizenstein et al., 1974
	BCG (Chemoth.)	1	Vogler&Chan, 1974
	BCG (- " -)	8	Gutterman et al., 1974
	BCG (- " -)	8	Whittaker&Slater, 1977
C L L	Serum Transfusion	8	Lazlo et al., 1968
C M L	BCG u. Lymphozyten	4	Sokal et al., 1973
M L	Xenogenes Antileukämieserum	8	DeCarvalho, 1962
	Leukosytertransfusion	8	Schwarzenberg et al., 1966
	Thymosin	8	Aleksandrowicz&Skotnicki, 1976
Lymphome	BCG	2	Sokal et al., 1974
	BCG	8	Jones&Salmon, 1977
	Serum Übertragung	8	Burkitt, 1967
	- " -	8	Ngu, 1967
	- " -	8	Fass et al., 1970

TUMORART	MODALITÄT	TYP	AUTOREN
Lungencarcinom	Coryne (Chemoth.)	1	Israel&Edelestein, 1975
	BCG	1	McKneally et al., 1976
	BCG	1	Pines, 1976
	Tumor-"Antigen" (und Chemoth.)	1	Stewart et al., 1977
	Tumorzellen (nach Neuraminidase)	1	Takita et al., 1977
	Coryne (Chemoth.)	8	Dimitrov et al., 1977
M e l a n o m	Laevamisol	8	Amery et al., 1975
	BCG	1	Morton et al., 1970
	BCG	1	Nathanson et al., 1972
	BCG	1	Seigler et al., 1972
	BCG	1	Pinsky et al., 1973
	BCG, PPD, Mumpsvirus und Streptococcus	1	Gerner& Moore, 1976
	Vaccinia-Virus	4	Milton& Lane Brown, 1966
	- " -	1	Hunter-Craig et al., 1970
	BCG	2	Elber et al., 1976
	BCG	3	Guterman et al., 1976
	Laevamisol	8	Spitler et al., 1977
	Bluttransfusion	8	Summer&Foraker, 1960
	homologe Tumorzellen und Leukozyten	8	Nadler&Moore, 1969
	- " -	4	Jewell et al., 1976
	Transfer Faktor	4	Jewell et al., 1976
Nierencarcinom	Immun-RNA	8	Ramming et al., 1977
	Antikörper-gebundenes Chlorambucil	8	Ghose et al., 1972
	Tumorzell-"Vakzine"	3	Tykkä et al., 1978
	Tumorzellextrakt (und Immun-RNA)	8	Skinner et al., 1976
Osteosarcom	Immun-RNA	8	Ramming&deKernion, 1977
	Tumorzellextrakt	8	Marcove et al., 1971
	allogene Tumorzellen u. Lymphozytenaustausch	8	Marsh et al., 1972
	Transfer-Faktor	8	Levin et al., 1975
	Virales Oncolysate	8	Green et al., 1976
Plattenepithel- carcinom	BCG (Chemoth.)	2	Richman et al., 1976
Prostatacarcinom	BCG	8	Merrin et al., 1975

Wichtig wäre noch zu erwähnen, daß ein Tumor oft erst dann diagnostiziert wird, wenn die immunologisch kritische Tumormasse bei weitem überschritten ist. Bei diesen Malignomen ist die chirurgische Entfernung der Hauptmasse die wichtigste Bedingung für eine erfolgreiche Immuntherapie, weil sie einen wesentlichen Beitrag zur Wiederherstellung des immunologischen Gleichgewichtes darstellt. Als gutes Beispiel

dafür dient die Beobachtung, daß sich Lungenmetastasen bei bestimmten Nierenkarzinompatienten nach Tumornephrektomie spontan zurückbildeten.

Nach den bisherigen Studien erscheint es unwahrscheinlich, daß Immuntherapie eine primäre Behandlungsmethode bei Krebs werden wird. Ausnahmen könnten lokal zugängliche Neoplasien wie Melanom oder andere Hautkarzinome sein.

Der Sinn der Immuntherapie ist hauptsächlich in der Stimulation der körpereigenen Abwehr und der Restauration der immunologischen Homöostase zu suchen.

Auch Stahl und Strahl werden nichts von ihrer Bedeutung verlieren. Wenn sie auch nur lokal und begrenzt eingreifen, so tragen sie auch mit zur Wiederherstellung des immunologischen Gleichgewichtes bei.

Auch die Chemotherapie bleibt ein potentiellles Mittel, wenn man davon ausgeht, daß sie tumorspezifisch ist. Bisher haben jedoch alle Zytostatika neben ihrer Toxizität ein Manko gezeigt, daß sie kinetisch nach 1. Ordnung wirken. Das bedeutet, daß nicht alle Tumorzellen vernichtet werden und der verbleibende Rest anderen Modalitäten vorbehalten bleiben muß.

Nach all diesen Überlegungen liegt der Schluß nahe, daß die größten Heilungschancen mit einem multimodalen Vorgehen zu erreichen sind, wobei Prinzipien entdeckt werden müßten, die selbst die kleinsten Restmengen von Tumorzellen völlig zerstören oder eliminieren können.

5. Z U S A M M E N F A S S U N G

5.1. Befunde beim Melanom

- 1) In menschlichen Melanomen konnten tumorassoziierte Membrankomponenten identifiziert werden.
- 2) Durch Ultraschall- und Detergensbehandlung gelang es, diese aus der Membran herauszulösen.
- 3) Ein dagegen gerichtetes Kaninchen-Antiserum reagierte nach Adsorption nur noch mit Membrankomponenten aus Melanomen, nicht jedoch mit solchen aus Normalgewebe wie Erythrozyten, Lymphozyten, Nieren- oder Hirngewebe.
- 4) Das Antimelanomserum zeigte außerdem Kreuzreaktion mit Membranfraktionen aus menschlichen Gliomen und Nierenkarzinomen.
- 5) Auch in vitro gezüchtete Melanomzellen produzieren die tumorassoziierten Membrankomponenten.
- 6) Auf Grund elektrophoretischer Analysen bestehen die tumorassoziierten Membrankomponenten aus mindestens 4 Polypeptiden mit einem abgeschätzten Molekulargewicht von 70.000, 40.000, 30.000 und 12.000 dalton.
- 7) Von den bisher getesteten Seren menschlicher Melanompatienten enthielten 70% präzipitierende Antikörper gegen die tumorassoziierten Membrankomponenten.

5.2. Befunde beim Gliom

- 1) Bei menschlichen Gliomen konnten ebenfalls tumorassoziierte Membrankomponenten nachgewiesen werden und durch Ultraschall- und Detergensbehandlung in lösliche Form gebracht werden.
- 2) Ein gegen Ultraschallextrakt produziertes Antiserum

reagierte nur noch mit Membranextrakten aus Gliomen und nicht mit solchen aus Normalgewebe.

- 3) Membranen von Melanomen und Nierenkarzinomen enthielten Komponenten, die mit dem Antigliomserum kreuzreagierten.
- 4) Auch bei in vitro gezüchteten Gliomzellen waren diese tumorassoziierten Membrankomponenten nachweisbar, woraus sich die Möglichkeit einer kontinuierlichen Antigenproduktion ableiten läßt.
- 5) Von den 20 bisher getesteten Seren von Gliompatienten enthielten 16 (80%) präzipitierende Antikörper gegen ein Gliommembranantigen.

5.3. Befunde beim Nierenkarzinom

- 1) Auch beim Nierenkarzinom konnten elektrophoretisch und immunologisch Hinweise für das Vorkommen von tumorassoziierten Membranantigenen erhalten werden.
- 2) Membranpräparationen aus Nierenkarzinomen zeigten außerdem Kreuzreaktionen mit dem Antimelanom- und dem Antigliomserum.

Die Gesamtbefunde lassen den Schluß zu, daß die bisher untersuchten menschlichen Malignome (Melanom, Gliom und Nierenkarzinom) immunologisch identische tumorassoziierte Membrankomponenten besitzen.

Ihre Relevanz bezüglich Immundiagnostik und Immuntherapie wird diskutiert.

6. MATERIAL UND METHODEN

6.1. Tumormaterial

6.1.1. Melanomgewebe

Der Großteil der untersuchten Melanome stammte von der Cancer Research Unit der McGill University in Montreal. Der Rest wurde mir von verschiedenen Wiener Kliniken zur Verfügung gestellt. Das Material wurde stets in tiefgefrorenem Zustand versandt und in meinem Laboratorium bis zur Aufarbeitung bei -85°C eingefroren.

6.1.2. Gliomgewebe

Material von menschlichen Gliomen wurde mir in dankenswerter Weise von der Neurochirurgischen Klinik der Universität München (Direktor: Prof. Dr. F. Marguth) zur Verfügung gestellt. Des weiteren erhielt ich Operationsmaterial auf Vermittlung von Prof. Dr. med. A. Lindner (Direktor des Instituts für Allgemeine und Experimentelle Pathologie der Universität Wien) aus der Neurochirurgischen Universitätsklinik in Wien. Das dabei vorhandene Normalhirngewebe aus der Tumorrandszone erwies sich als günstigstes Vergleichsmaterial. Normalhirngewebe für präparative Zwecke erhielt ich dank der Kooperationsbereitschaft des Instituts für Rechtsmedizin der Universität München (Direktor: Prof. Dr. W. Spann). Es wurde portioniert bis zur Aufarbeitung ebenfalls bei -85°C eingefroren.

6.1.3. Nierenkarzinom und Normalnierengewebe

Alle bisher untersuchten Nierenkarzinome entstammten der Urologischen Klinik der Universität München (Direktor: Prof. Dr. E. Schmiedt). Sie wurden unmittelbar nach der Operation vom Pathologen untersucht. Dabei wurde Tumorgewebe vom makroskopisch als Normalparenchym eingestuften Gewebe abgetrennt. Letzteres wurde als Kontrollmaterial verwendet. In Einzelfällen wurde Normalgewebe von nicht Tumor-befallenen Nieren als Vergleichsmaterial herangezogen.

6.2. Präparation von Zellmembranen

Bis zur Homogenisation wurde Melanom-, Gliom- und Nierenkarzinommaterial in gleicher Weise aufgearbeitet. Dazu wurden Bindegewebe und Nekrosen entfernt und der Tumor wie Normalgewebe in erbsengroße Stücke zerkleinert. Nach Zugabe von Phosphat-gepuffelter physiologischer Kochsalzlösung (PBS; pH = 7.2; 10 ml/g Gewebe) wurde das Material in einem Mixer bei 200 Umdrehungen pro Minute weiter zerkleinert. Der erhaltene Zellbrei wurde 5 min bei 5.000 UpM zentrifugiert. Das Sediment mit den Zellen wurde durch Suspension und anschließender Zentrifugation nochmals gewaschen. Dieser Waschvorgang wurde so oft wiederholt, bis der Zentrifugationsüberstand klar und farblos war. Damit konnte das Material weitgehend von Hämoglobin und Serumproteinen befreit werden. Von diesem Material wurde stets das Feuchtgewicht bestimmt und danach homogenisiert, wobei für Melanom, Gliom und Nierenkarzinom verschiedene Homogenisationspuffer verwendet wurden.

6.2.1. Zellmembrangewinnung aus menschlichem Melanomgewebe

Homogenisationspuffer: 0.25 M Saccharose, 10 mM Tris-HCl,
(H-Puffer) 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH = 8.3;

- Homogenisation:
- 1) 10 Volumenteile H-Puffer pro g Feuchtgewicht zugeben und suspendieren.
 - 2) 10 sec im Ultraturrax bei Stufe 8 homogenisieren.
 - 3) Zellhomogenat mittels Glas-Teflon-Potter durch 10maliges Auf- und Abfahren des Stempels weiter desintegrieren.
 - 4) Homogenat durch 3 Lagen Mull filtrieren.
 - 5) Filtriertes Homogenat nach folgendem Schema differentiell zentrifugieren:

Differentielle Zentrifugation:

- 1) Homogenat 10 min bei 3.000 x g sedimentieren:
Überstand (= U_1) und Sediment (= S_1)
- 2) U_1 10 min bei 12.000 x g sedimentieren: U_2 und S_2
- 3) U_2 auf 10 ml 20% Glyzerin in 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl und 2 mM EDTA (TNE; pH = 8.3) überschichten und 60 min bei 100.000 x g sedimentieren: U_3 und S_3 .
- 4) S_3 in 50 mM K-Zitrat (pH = 7.2) suspendieren und auf diskontinuierlichem Saccharosegradienten weiter auftrennen.

Dichtegradienten-Zentrifugation:

Auf 2 ml 50% Saccharose in 50 mM K-Zitrat (pH = 7.2) jeweils 2 ml 45%, 40%, 35%, 30% und 25% Saccharose überschichten und darauf vorsichtig die Suspension von S_3 pipettieren. Anschließend 5 Stunden bei 40.000 UpM im SW 40 Rotor zentrifugieren. Nach elektronenmikroskopischer Kontrolle finden sich die reinsten Membranen in der Grenzphase zwischen 30%iger und 35%iger Saccharose. Das entspricht einer Dichte von 1.139 g/ml bei 20.0°C.

Diese Methode der Zellmembranisolierung entspricht der für das Hamstermelanom entwickelten (Birkmayer, 1973), die für das menschliche Melanom etwas modifiziert wurde (Birkmayer, 1974a).

6.2.2. Zellmembrangewinnung aus menschlichen Gliomen

Homogenisationspuffer: 0.29 M Saccharose, 10 mM Tris-HCl,
(H-Puffer) 5 mM $MgCl_2$, pH = 7.2;

- Homogenisation:
- 1) 10 Volumenteile H-Puffer pro g Feuchtwicht zugeben und suspendieren.
 - 2) 10 sec im Ultraturrax bei Stufe 8 homogenisieren.
 - 3) Zellhomogenat mittels Glas-Teflon-Potter durch 10maliges Auf- und Abfahren des Stempels weiter desintegrieren.
 - 4) Homogenat durch 3 Lagen Mull filtrieren.
 - 5) Filtriertes Homogenat anschließend differentiell zentrifugieren:

Differentielle Zentrifugation:

- 1) Homogenat 10 min bei 3.000 x g zentrifugieren:
Überstand (= U_1) und Sediment (= S_1)
- 2) U_1 20 min bei 6.000 Upm (Sorvall Rotor SS 34) sedimentieren: U_2 und S_2 .
- 3) S_2 mit 10 mM Tris-HCl pH = 7.2 waschen und über diskontinuierlichen Saccharosegradienten weiter auftrennen.

Dichtegradienten-Zentrifugation:

Analog der Zellmembranisolierung aus Melanomgewebe wurde ein diskontinuierlicher Saccharosegradient von 50% bis 25% hergestellt und die Suspension des Sedimentes S_3 vorsichtig daraufgeschichtet. Anschließend wurde 5 Stunden

bei 40.000 UpM im SW 40 Rotor zentrifugiert. Nach elektronenmikroskopischer Kontrolle finden sich die reinsten Zellmembranen in der Grenzphase zwischen 30- und 35%iger Saccharose. Das entspricht einer Dichte von 1.139 g/ml bei 20.0°C.

Bei der Isolierung von Zellmembranen aus Hirngewebe wurde im wesentlichen nach der Methode von Wahlström et al. (1974) vorgegangen.

6.2.3. Zellmembrangewinnung aus menschlichem Nierengewebe

Homogenisationspuffer: 0.25 M Saccharose, 10 mM Tris-HCl,
(H-Puffer) 5 mM EDTA, 2 mM Dithiothexitol,
pH = 7.6;

- Homogenisation: 1) 10 Volumenteile H-Puffer auf 1 g Feuchtwicht der gewaschenen Zellen zugeben und suspendieren.
- 2) 10 sec im Ultraturrax bei Stufe 8 homogenisieren.
- 3) Zellhomogenat mittels Glas-Teflon-Potter durch 10maliges Auf- und Abfahren des Stempels weiter desintegrieren.
- 4) Homogenat durch 3 Lagen Mull filtrieren.
- 5) Filtriertes Homogenat nach folgendem Schema differentiell zentrifugieren:

Differentielle Zentrifugation:

- 1) Homogenat 10 min bei 3.000 x g sedimentieren:
Überstand (= U_1) und Sediment (= S_1)
- 2) S_1 in H-Puffer suspendieren und nochmals 10 min bei 3.000 x g sedimentieren: U_{1a} und S_{1a} .
- 3) U_1 und U_{1a} vereinigen und 20 min bei 10.000 x g sedimentieren: U_2 und S_2 .

- 4) U_2 20 min bei 15.000 x g sedimentieren: U_3 und S_3 .
- 5) S_3 in 10 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA und 2 mM Dithiothreitol pH = 7.6 suspendieren und über Saccharosedichtegradienten weiter auftrennen.

Dichtegradienten-Zentrifugation:

Zunächst wurde ein diskontinuierlicher Saccharosegradient bestehend aus je 5 ml einer 35%igen, 38%igen, 41%igen und 44%igen Saccharoselösung in 0.1 M Tris-HCl, pH = 7.6, hergestellt, auf den die Suspension von S_3 vorsichtig überschichtet wurde. Anschließend wurde 7 Stunden bei 91.000 x g zentrifugiert. Es wurden danach mehrere Banden beobachtet, von denen die bei einer Dichte von 1.159 morphologisch die homogensten Membranen zeigte. Die Zellmembrangewinnung aus Nierenkarzinom bzw. aus Normalnierengewebe erfolgte im wesentlichen nach der von Mondorf et al. (1972) etablierten Methode.

Abschließend sollte noch bemerkt werden, daß alle Präparations-schritte stets unter Eiskühlung bei einer Temperatur von 0° - 4°C durchgeführt wurden.

6.2.4. Zellmembrangewinnung aus in vitro gezüchteten Tumorzellen

Die Isolierung von Zellmembranen aus in vitro gezüchteten Tumorzellen erfolgte nach der von Warren et al. (1969) etablierten Methode unter Verwendung von Zinkionen. Dazu wurden die Zellen im Zuchtgefäß mit Phosphat-gepuffelter physiologischer Kochsalzlösung (PBS, pH = 7.2) 2mal gewaschen und in PBS suspendiert (Konzentration: 5×10^7 Zellen/ml PBS). Pro ml Zellsuspension wurden 3 ml 1 mM $ZnCl_2$ zugefügt und 10 min bei 20°C stehengelassen. Anschließend wurde mit Eis

auf 4°C gekühlt und die Suspension mittels eines Glas-Glas-Potters durch 20 Auf- und Abwärtsbewegungen vorsichtig homogenisiert. Das Homogenat wurde mit gleichen Volumenteilen 60%iger Saccharose gemischt und auf einen diskontinuierlichen Saccharosegradienten aufgetragen. Dieser bestand der Reihenfolge nach aus 15 ml 50%iger, 10 ml 48%iger, 25 ml 45%iger, 20 ml 43%iger, 10 ml 40%iger und 10 ml 35%iger Saccharose. Es wurde 30 min bei 1.500 x g zentrifugiert. Die Zellmembranen sedimentierten in der Grenzschicht zwischen der 35%igen und der 40%igen sowie der 43%igen Saccharose. Die beiden Schichten wurden mit einer waagrecht gebogenen Pasteurpipette abgezogen, mit gleichen Volumenteilen PBS gemischt und auf einen weiteren diskontinuierlichen Saccharosegradienten aufgetragen. Er setzte sich zusammen aus 3 ml 65%iger, 3 ml 60%iger, 4 ml 55%iger, 6 ml 50%iger, 5 ml 45%iger und 5 ml 40%iger Saccharose. Nach Auftragen der Suspension des ersten Gradienten wurde 60 min bei 90.000 x g zentrifugiert. Die beste Anreicherung an Zellmembranen wurde in der Bande mit der Dichte 1.202 g/ml bei 20.0°C gefunden.

6.3. Gewinnung der Ultraschall-löslichen Membranproteine

- 1) Sediment der gereinigten Membranen in PBS suspendieren.
- 2) Proteinkonzentration auf 2 mg/ml adjustieren.
- 3) 10 mal 30 sec beschallen unter Eiskühlung, wobei jeweils nach 30 Sekunden eine ebensolange Kühlpause eingelegt wird.
- 4) Beschallte Suspension 60 min bei 100.000 x g zentrifugieren:
Überstand = Ultraschall-lösliche Membranproteine
Sediment = Ultraschall-unlösliche Membranproteine

Der Ultraschall-unlösliche Membrananteil wurde einer Detergentienbehandlung unterzogen.

6.4. Gewinnung der Triton-X-100 löslichen Membranproteine

- 1) Ultraschall-unlöslichen Membrananteil in PBS suspendieren und auf eine Proteinkonzentration von 5 mg/ml adjustieren.
- 2) Pro ml Suspension 0.1 ml 5% Triton-X-100 zufügen, gut vermischen und 30 min bei 20°C inkubieren.
- 3) Suspension 60 min bei 100.000 x g zentrifugieren:
Überstand = Triton-X-100 lösliche Membranproteine,
Sediment = Triton-X-100 unlösliche Membranproteine.

6.5. Elektrophoretische Analyse auf Polyacrylamidgelen

6.5.1. Probenvorbereitung

- 1) Proben gegen H_2O dialysieren (10 ml Probe gegen 2 l H_2O) unter zweimaligem Wechseln des Dialysates.
- 2) 0.5 mg Protein pro Probe nehmen und lyophilisieren.
- 3) Getrocknete Proben in Lösungspuffer auflösen (0.1 ml Puffer pro 0.5 mg Protein). Der Lösungspuffer besteht aus: 2% Natriumdodecylsulfat, 1% Mercapto-äthanol, 10 mM Tris-HCl, pH = 8.3, 10% Glyzerin und 0.05% Bromphenolblau.
- 4) 20 μ l Probe (= 0.1 mg Protein) werden pro Gelröhrchen aufgetragen.

6.5.2. Herstellen der Polyacrylamidgele

Folgende Standardlösungen wurden verwendet:

- 1) Acrylamidlösung A-30: 30.0 g Acrylamid und 0.8 g Bis-methylenacrylamid in 100 ml H_2O lösen.
- 2) Elpho-Puffer: 1 M Tris-HCl, pH = 8.3; 1% SDS
- 3) TEMED (= Tetramethyl-Äthyldiamin)
- 4) 1% Ammonperoxidisulfat (stets frisch bereiten, da auch im Kühlraum nur einige Stunden haltbar).

Zur Herstellung von 10%igen Polyacrylamidgelen werden die Standardlösungen wie folgt gemischt:

- 20,00 ml A-30
- 6,00 ml Elpho-Puffer-Standard
- 0,12 ml TEMED
- 35,48 ml H_2O
- 0,40 ml Ammonperoxidisulfat

Die Mischung wird 1 min am Wasserstrahlvakuum entgast und davon 2.5 ml in jedes Glasröhrchen einpipettiert und vorsichtig mit 20 μ l 20%igem Äthanol überschichtet. Nach 30 bis 60 Minuten ist das Acrylamid polymerisiert, und die Elektrophorese kann nach Auftragen der Proben gestartet werden.

Als Elektrophoresepuffer wurde 0.1 M Tris-HCl, 0.1% SDS, pH = 8.3, verwendet. Nach einem 60minütigen Vorlauf bei 8 mA/Röhrchen wurden die Proben aufgetragen und 20 Minuten bei niedriger Stromstärke (1 mA/Röhrchen) einwandern gelassen. Die Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 8 mA/Röhrchen so lange, bis das Standardprotein Cytochrom c 6 cm in das Gel eingewandert ist.

Nach dem Lauf wurden die Gele durch Umspülen mit Pufferlösung aus dem Glasröhrchen herausgeholt und 2 Stunden in ein Färbebad getaucht. Das Färbebad bestand aus:

0.1% Coomassie-Brillant-Blau R-250 in

Methanol:Eisessig: H_2O (5:1:5, v:v:v).

Anschließend wurden die Gele im gleichen Lösungsmittel entfärbt, bis der Untergrund völlig transparent war.

Eine wesentlich bessere Auftrennung vor allem im niedermolekularen Bereich wurde mit Gradientengelen erhalten, die 7,5% bis 25% an Acrylamid waren. Ihre Herstellung erfolgte auf folgende Weise:

Lösung 1 (= 7,5% Acrylamid):

20,00 ml A-30
8,00 ml Elpho-Puffer-Standard
0,16 ml TEMED
51,34 ml H₂O
0,50 ml Ammonperoxidisulfat

Lösung 2 (= 25% Acrylamid):

50,00 ml A-30
6,00 ml Elpho-Puffer-Standard
0,12 ml TEMED
3,48 ml H₂O
0,40 ml Ammonperoxidisulfat

Lösung 1 und 2 wurden vorgekühlt und anschließend mittels einen Gradientenmischers (LKB-Instruments) und einer Pumpe gleichzeitig und von unten in alle Röhrchen innerhalb von 10 Minuten eingefüllt, die Röhrchen mit 20 µl 20% Äthanol überschichtet und polymerisieren gelassen. Die abgeschlossene Polymerisation war am Auftreten einer ganz scharfen Grenzschicht zwischen Polyacrylamid und dem Äthanol zu erkennen. Das Probenauftragen und die Elektrophorese wurden dann völlig identisch wie bei den 10%igen Gelen durchgeführt. Die Trenndauer ergab sich aus der 6 cm - Wanderungstrecke des Cytochroms c.

6.6. Methoden der Zellzüchtung

6.6.1. Anlegen von Primärkulturen menschlicher Melanome

Im Prinzip gibt es mehrere Möglichkeiten, Zellen *in vitro* zu züchten. Voraussetzung bei allen ist die Dissoziation von Einzelzellen aus dem Gewebeverband. Sie kann entweder mechanisch erfolgen oder mit Hilfe chemischer Einflüsse erreicht werden. Am gebräuchlichsten ist die Verwendung von Trypsin zur enzymatischen Spaltung der interzellulären Verbindungen. Manche Zellen sind jedoch überaus empfindlich gegenüber Trypsin, was eine Zerstörung der Zellen zur Folge hat. Diese Zellen disaggregiert man daher am besten mechanisch.

A) Primärkultur ohne Trypsin

- 1) Tumormaterial von Bindegewebe, Gefäßen und Nekrosen befreien und mit PBS waschen.
- 2) Gewebe mit Schere und Skalpell auf Stecknadelkopf-große Stücke zerkleinern.
- 3) Zugabe von Kulturmedium und weiteres Dissoziieren durch wiederholtes Aufziehen in eine großlumige Pipette.
- 4) Durch 3 Lagen Mull filtrieren und Zellsuspension anschließend 10 min bei 1.000 UpM zentrifugieren.
- 5) Sediment in neuem Medium suspendieren. Zellzahl ermitteln und in Plastikgefäße einsäen.

B) Primärkultur unter Verwendung von Trypsin

- 1) PBS-gewaschene und zerkleinerte Tumorstücke in Trypsiniergefäß überführen (= Erlenmeyerkolben mit seitlichen Stutzen) und pro g Tumorgewebe 20 ml Trypsin (1:250 verdünnt) zusetzen und unter Rühren 3 mal 5 min bei 37°C dissoziieren.

- 2) Zellsuspension durch 3 Lagen Mull filtrieren und das Filtrat nach Zugabe von gleichen Mengen Medium mit 10% Serum 10 min bei 1.000 UpM zentrifugieren.
- 3) Das Sediment wird 3mal mit Medium und 10% Serum gewaschen.
- 4) Das gewaschene Zellsediment wird in wenig Medium suspendiert. Davon wird die Zellzahl bestimmt und anschließend werden die Zellen nach entsprechender Verdünnung in die Plastikzuchtgefäße eingesät.

C) Primärkultur von Tumorzell-haltigen Exsudaten

Bei einigen Melanomen konnte durch Pleurapunktion Tumorzell-haltiges Material gewonnen werden, das nach folgendem Schema aufgearbeitet wurde:

- 1) Exsudatflüssigkeit 10 min bei 1.000 UpM zentrifugieren und 3mal mit Medium durch wiederholtes Suspendieren und Zentrifugieren waschen.
- 2) Sediment der gewaschenen Tumorzellen in wenig Medium suspendieren, Zellzahl ermitteln und in entsprechender Konzentration in die Zuchtgefäße pipettieren.

Für Melanomzellen wurde primär Medium 199 (Morgan et al., 1950) verwendet, das 10% fötales Kälberserum sowie Glutamin, Hepes, Bicarbonat und die Antibiotika Penicillin, Streptomycin und Gentamycin enthielt. In einigen Fällen wurde auch das Medium RPMI 1640 (Moore et al., 1967) mit den gleichen Zusätzen verwendet.

6.6.2. Anlegen von Primärkulturen menschlicher Gliome

Bei den gegenüber Trypsin relativ empfindlichen menschlichen Gliomzellen wurde hauptsächlich die mechanische Zellsaggregation angewandt, die mit der bei Melanomen angewandten Prozedur identisch war. Als Primärmedium diente sowohl Medium 199 wie RPMI 1640 mit den gleichen Zusätzen. Besonders wichtig war bei Gliomen und auch bei normalen Gliazellen das ausgiebige Waschen, um die Zellen möglichst vollständig von Erythrozyten zu befreien. Das Anwachsen der Zellen und die Proliferationsrate war im wesentlichen von folgenden Faktoren abhängig:

- 1) Möglichst rasches Anlegen der Primärkultur postoperativ. Limitierender Faktor war hierbei das Transportproblem.
- 2) Zellen wuchsen mit zunehmendem neuropathologischem Malignizitätsgrad besser (Einteilung: Grad I - IV).
- 3) Wachstum der Zellen war abhängig vom Alter des Patienten. Zellen jüngerer Patienten wuchsen auffallend besser.

6.6.3. Anlegen von Primärkulturen menschlicher Nierenkarzinome und normaler Nierenparenchymzellen

- 1) Gewebe von Gefäßen, Nekrosen und anderen Kontaminationen befreien, mit PBS mehrmals waschen und mit Schere und Skalpell in 1 mm³ große Stücke zerkleinern.
- 2) Material in Trypsiniergefäß überführen und nach Zugabe von Trypsin-EDTA (20 ml/g Zellen) und Glasperlen 10 min bei 37°C unter Rühren desaggregieren.
- 3) Zellsuspension durch 3 Lagen sterilen Mulls filtrieren und danach gleiche Volumenteile mit Medium, das

10% Serum enthält, zugeben. Durch die im Serum enthaltenen Trypsininhibitoren wird die Verdauungsaktivität des Trypsins gehemmt und die Zellen dadurch nicht weiter geschädigt.

- 4) Zellsuspension 10 min bei 1.000 UpM zentrifugieren.
- 5) Zellsediment 3mal mit Medium waschen, anschließend in wenig Medium suspendieren, Zellzahl ermitteln und in entsprechender Konzentration in die Zuchtgefäße einsäen.
- 6) Der im Trypsiniergefäß verbliebene Rest an nicht dissoziierten Zellen kann durch 1- bis 2malige Wiederholung der Trypsinierprozedur weiter zu desaggregieren versucht werden, um die Ausbeute zu erhöhen. Bei Nierenkarzinom- und Normalnieren wurden die besten Anwachsrate bei einer Zellzahl von $10^5/\text{cm}^2$ Wachstumsfläche beobachtet, wobei sich Plastik als Anwachsmatrix gegenüber Glas als vorteilhafter erwies.

6.6.4. Subkultivieren (Passagieren) von Primärkulturen

- 1) Medium mit steriler Kanüle absaugen
- 2) Zellrasen mit PBS (ohne Kalzium und Magnesium) überschichten und 3 min stehenlassen.
- 3) PBS Lösung absaugen und verwerfen.
- 4) Zellrasen mit Trypsin-EDTA möglichst dünn überschichten und 3 min bei 37°C unter vorsichtigen Kippbewegungen inkubieren.
- 5) Zugabe gleicher Volumenteile Medium mit 10% Serum und Ablösen des Zellrasens durch wiederholtes Abspritzen mit einer Pipette.

- 6) Zellsuspension 10 min bei 1.000 UpM zentrifugieren und 1mal mit Medium waschen.
- 7) Zellzahl bestimmen und in entsprechender Konzentration in Kulturgefäße einpipettieren.

Alle Primärkulturen sowie die Subkulturen wurden zur besseren pH-Regulierung in 5% CO₂-Atmosphäre bei 37°C inkubiert, bis sich die Zellen gespreitet haben und an der Matrix angewachsen waren. Stabile gut wachsende Zellen wurden danach im normalen Brutschrank bei 37°C inkubiert. Bei Tumorzellen wurden die Medien 199 oder RPMI 1640 sukzessive durch Minimal-Medium entweder nach Eagle (1959) oder nach Dulbecco (1970) ersetzt. Dazu wurden die Zellen zunächst mit einer 1:1 Mischung der Medien 199 und Eagle-Minimal gefüttert und nach 2 Tagen mit reinem Minimal-Medium inkubiert.

Alle Medien enthielten die gleichen Zusätze wie:

10% fötales Kälberserum, 20 mM Glutamin, 4 mM Hepes-Puffer, 6,5 mM NaHCO₃, Penicillin (5x10⁵ IE/l), Streptomycin (5 µg/l), Gentamycin (10 µg/l Medium).

Die drei hauptsächlich verwendeten Kulturmedien hatten folgende Zusammensetzung:

1) Minimum Essential Medium (MEM) nach Eagle (1959):

Zusammensetzung:

Aminosäuren	mg/l	Sonstige Substanzen	mg/l
L-Arginin · HCl	126,40	D (+) - Glucose · H ₂ O	1100,0
L-Cystin · 2 HCl	31,30	Phenolrot, Na	10,6
L-Glutamin	292,30		
L-Histidin · HCl · H ₂ O	41,90		
L-Isoleucin	52,50	Anorganische Salze	
L-Leucin	52,50	<i>Earle's Salze</i>	
L-Lysin · HCl	73,06	CaCl ₂ · 2 H ₂ O	265,0
L-Methionin	14,90	KCl	400,0
L-Phenylalanin	33,02	MgSO ₄ · 7 H ₂ O	200,0
L-Threonin	47,64	NaCl	6800,0
L-Tryptophan	10,20	NaHCO ₃	2200,0
L-Tyrosin	36,22	NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	140,0
L-Valin	46,90		
Vitamine		<i>Hanks' Salze</i>	
Ca-D (+) - Pantothenat	1,0	CaCl ₂ · 2 H ₂ O	185,5
Cholinchlorid	1,0	KCl	400,0
Folsäure	1,0	KH ₂ PO ₄	60,0
meso-Inositol	2,0	MgSO ₄ · 7 H ₂ O	200,0
Nicotinsäureamid	1,0	NaCl	8000,0
Pyridoxal · HCl	1,0	Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O	60,0
Riboflavin	0,1	NaHCO ₃	350,0
Thiamin · HCl	1,0		

2) Medium RPMI 1640 nach Moore et al. (1967):

Zusammensetzung:

Aminosäuren	mg/l		mg/l
L-Arginin	200,0	Cholinchlorid	3,0
L-Asparagin · H ₂ O	56,82	Folsäure	1,0
L-Asparaginsäure	20,0	meso-Inosit	35,0
L-Cystin · 2 HCl	65,17	Nicotinsäureamid	1,0
L-Glutamin	300,0	p-Aminobenzoessäure	1,0
L-Glutaminsäure	20,0	Pyridoxin · HCl	1,0
Glutathion	1,0	Riboflavin	0,2
Glycin	10,0	Thiamin · HCl	1,0
L-Histidin	15,0	Vitamin B ₁₂	0,005
L-Hydroxyprolin	20,0		
L-Isoleucin	50,0	Sonstige Substanzen	
L-Leucin	50,0	D(+) - Glucose · H ₂ O	2200,0
L-Lysin · HCl	40,0	Phenolrot, Na	5,3
L-Methionin	15,0		
L-Phenylalanin	15,0		
L-Prolin	20,0		
L-Serin	30,0		
L-Threonin	20,0	Anorganische Salze	
L-Tryptophan	5,0	Ca(NO ₃) ₂ · 4 H ₂ O	100,0
L-Tyrosin	20,0	KCl	400,0
L-Valin	20,0	MgSO ₄ · 7 H ₂ O	100,0
Vitamine		NaCl	6000,0
D-Biotin	0,2	Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O	1003,6
Ca-D(+)-Pantothenat	0,25	NaHCO ₃	2000,0

3) Medium 199 mit Earle's Salzen nach Morgan et al. (1950):

Zusammensetzung:

Aminosäuren	mg/l		mg/l
L-Alanin	25,00	DL-α-Tocopherolphosphat, Na ₂	0,01
L-Arginin · HCl	70,00	Vitamin A-acetat	1,1147
L-Asparaginsäure	30,00	Sonstige Substanzen	
L-Cystein · HCl · H ₂ O	0,11	Adeninsulfat	10,0
L-Cystin · 2 HCl	26,069	ATP, Na ₂	1,0
L-Glutamin	100,00	A-5-MP	0,2
L-Glutaminsäure	66,82	Cholesterin	0,2
Glycin	50,00	2-Desoxy-D-Ribose	0,5
L-Histidin · HCl · H ₂ O	21,88	D(+) - Glucose · H ₂ O	1100,0
L-Hydroxyprolin	10,00	Glutathion	0,05
L-Isoleucin	20,00	Guanin · HCl	0,3
L-Leucin	60,00	Hypoxanthin	0,3
L-Lysin · HCl	70,00	Na-acetat · 3 H ₂ O	60,0
L-Methionin	15,00	Phenolrot, Na	15,9
L-Phenylalanin	25,00	D(—)-Ribose	0,5
L-Prolin	40,00	Thymin	0,3
L-Serin	25,00	Tween 80	20,0
L-Threonin	30,00	Uracil	0,3
L-Tryptophan	10,00	Xanthin	0,3
L-Tyrosin	40,00		
L-Valin	25,00	Anorganische Salze	
Vitamine		<i>Earle's Salze</i>	
L-Ascorbinsäure	0,05	CaCl ₂ · 2 H ₂ O	265,0
D-Biotin	0,01	Fe(NO ₃) ₃ · 9 H ₂ O	0,1
Calciferol (Vit. D ₂)	0,10	KCl	400,0
Ca-D(+)-Phantothenat	0,01	MgSO ₄ · 7 H ₂ O	200,0
Cholinchlorid	0,50	NaCl	6800,0
Folsäure	0,01	NaHCO ₃	2200,0
meso-Inosit	0,05	<i>Hanks' Salze</i>	
Menadion-Na-bisulfit	0,01	CaCl ₂ · 2 H ₂ O	185,5
Nicotinsäure	0,025	Fe(NO ₃) ₃ · 9 H ₂ O	0,1
Nicotinsäureamid	0,025	KCl	400,0
p-Aminobenzoessäure	0,05	KH ₂ PO ₄	60,0
Pyridoxal · HCl	0,025	MgSO ₄ · 7 H ₂ O	200,0
Pyridoxin · HCl	0,025	NaCl	8000,0
Riboflavin	0,01	NaHCO ₃	350,0
Thiamin · HCl	0,01	Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O	60,0

Als weitere Standardlösungen dienen:

L-Glutamin (200 mM) (stets in eingefrorenem Zustand aufbewahren!)

Hepes-Puffer (1 M)

Natriumhydrogencarbonat (7,5%)

Penicillin/Streptomycin (100.000 IE und 0.1 mg Streptomycin/ml)

Trypsin (1:250, 0.05%) - EDTA (0.02%) in PBS (ohne Kalzium und Magnesium)

Weitere Details der Gewebekultur von Tumor- und Normalzellen können den Monographien von Paul (1965), Mayr et al. (1974) und Fogh (1975) entnommen werden. Die darin angeführten Methoden zur Züchtung von Tumorzellen wurden von mir auf die jeweiligen Malignome entsprechend adaptiert.

6.7. Immunologische Methoden

6.7.1. Immunisierungsschema bei Kaninchen

- 1) Kaninchen mindestens 12 Stunden nüchtern setzen.
- 2) Impfstellen enthaaren (zuerst mit Schere, dann mit Enthaarungscreme).
- 3) Nullserum aus der Ohrvene abnehmen.
- 4) Antigen 1:1 mit komplettem Freud-Adjuvans mischen und davon 0.5 ml subkutan in die Oberseite der Pfoten applizieren (1. Antigenapplikation)
- 5) 1 Woche nach 1. Antigenapplikation Boosterung:
Je 0.5 ml Antigen (ohne Freud-Adjuvans) an 4 Stellen intramuskulär applizieren.
- 6) 2 Wochen nach 1. Antigenapplikation:
 - a) Blut abnehmen und Serumtiter bestimmen (dabei dürfen dem Kaninchen maximal 40 ml Blut abgenommen werden).
 - b) 2. Boosterung: 0.5 ml Antigenpräparation subkutan an 4 Stellen im Rücken applizieren.

- 7) Jede Woche Blut abnehmen und Serumtiter bestimmen.
- 8) Wenn Titer nicht entsprechend angestiegen ist, nochmalige Boosterung nach 6 Wochen mit 4 mal 0.5 ml Antigen s.c. in den Rücken.
- 9) 1 Woche danach (= 7 Wochen nach 1. Antigenapplikation) nochmals 0.5 ml Antigen an 4 Stellen i.m. injizieren.
- 10) Jede Woche Blut abnehmen und Serumtiter bestimmen.

6.7.2. Gewinnung des Antiserums und der Immunglobulinfraktion

- 1) Blut 3 Stunden bei Zimmertemperatur stehenlassen, anschließend 20 min bei 4.000 UpM zentrifugieren.
- 2) Serum abpipettieren, zu 1.0 ml Portionen in Plastik-Reagiergefäße abfüllen und bei -20°C einfrieren bis zur weiteren Verwendung.

Zur Gewinnung der Immunglobulinfraktion wird das adsorbier- te oder nicht-adsorbierte Serum 60 min bei 56°C zur Inakti- vierung des Komplements inkubiert. Danach wird zu je 10 ml Serum 8.8 ml gesättigte Ammonsulfatlösung ($\text{pH} = 7.2$) trop- fenweise zugegeben und die Lösung ständig am Vortex durch- mischt. Die präzipitierten Immunglobuline werden durch eine 5minütige Zentrifugation bei 4.000 UpM gesammelt und 5mal mit 45% gesättigter Ammonsulfatlösung gewaschen. Anschließend wird das Sediment in der kleinstmöglichen Menge PBS aufge- löst - für die Gammaglobuline von 10 ml Serum sind dazu etwa 2 ml PBS erforderlich -. Die gelösten Immunglobuline werden durch 2malige Dialyse gegen PBS vom störenden Ammonsulfat befreit.

6.7.3. Immundoppeldiffusionstest

Der Immundoppeldiffusionstest wurde im wesentlichen nach der erstmals von Ouchterlony (1958) beschriebenen Prozedur durchgeführt. Folgende Reagenzien wurden dabei verwendet:

- 1) Barbitäl-Puffer, pH = 8.2:
13,38 g 5,5' Diäthylbarbituratsäure-Natriumsalz und 8,83 g Natriumazetat $\times$ 3H₂O werden in 1,5 Liter H₂O gelöst und mit konzentrierter Essigsäure auf pH = 8.2 eingestellt.
- 2) Herstellen der 1,5%igen Agarosegele:
3,0 g Agarose-H (LKB-Instruments) wurde in 100 ml H₂O eingerührt, dem 100 ml Barbitälpuffer beigefügt wurde. Die Suspension wurde unter Erhitzen bis auf 80°C gelöst und zur Konservierung Natriumazid (Endkonzentration 0.1%) und Cialit als Antimykotikum (Endkonzentration 0.01%) zugegeben. Die Agaroselösung wurde nach Abkühlenlassen auf 60°C mit einer 25 ml-Pipette auf Glasplatten (10 $\times$ 10 cm) aufgetragen und bei Raumtemperatur gelieren gelassen. Nach etwa 2 Stunden waren die Agaroseplatten für die Immundoppeldiffusion einsatzbereit.
- 3) Die Proben wurden mit Mikropipetten aufgetragen, nachdem die einzelnen Löcher unter Wasserstrahlvakuum herausgestanzt wurden. Die Agarosegellplatten wurden 48 Stunden in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert und danach ausgewertet. Die Empfindlichkeit der Immunpräzipitation wurde durch Anfärben mit Coomassie-Blau erhöht. Dazu wurden die Platten auf Filterpapier getrocknet und anschließend 20 min in das Färbebad gelegt.
(Färbebad: 0.1% Coomassie-Brillant-Blau R 250 in Methanol:Eisessig:H₂O, 5:1:5, v/v/v)

Die Agaroseplatten wurden anschließend durch Schütteln in einem Entfärbebad bei 37°C von überschüssigem Farbstoff befreit. (Entfärbebad: Methanol:Eisessig:H₂O, 5:1:5). Nach Trocknen der angefärbten Platten in Luft wurden sie zur Dokumentation fotografiert.

6.7.4. Gegenstromelektrophorese auf Agaroseplatten

Die Gegenstromelektrophorese, gelegentlich auch als Immunelectroosmophorese bezeichnet, ist eine rasche und relativ empfindliche Methode zum Nachweis bestimmter Antigene oder präzipitierender Antikörper. Das Prinzip beruht auf der Kombination von Elektrophorese und Elektroendoosmose. Unter den gewählten Bedingungen von pH = 8.2 wandern die negativ geladenen Antigene zur Anode, und die Antikörper wandern auf Grund von Elektroendoosmose zur Kathode. Wo sich Antigen und Antikörper im Gel treffen, bildet sich eine Präzipitationslinie aus, die nach Stärke der Radialdiffusion gerade bis halbkreisförmig sein kann.

Es wurden die gleichen 1.5%-Agarose-H Platten wie für die Immundiffusion verwendet. Mittels Schablone wurden 12 Löcher von 4 mm Durchmesser ausgestanzt und im Abstand von 1,5 cm eine weitere Reihe von 12 Löchern von 4 mm Durchmesser. Die ausgestanzten Platten wurden in eine Flachgelelektrophoresekommer platziert und die mit Puffer gesättigten Filterpapierstreifen vorsichtig am Rand der Platten aufgelegt. Um Diffusion zu verhindern, wurden die Proben und die Antiseren möglichst rasch aufgetragen und die Elektrophorese nach Abdecken der Platten mit Parafilm gestartet. Die Elektrophorese wurde unter Wasserkühlung 2 Stunden bei 5 Volt/cm bei konstantem Strom durchgeführt. Nach

dem Lauf wurden die Platten auf sichtbare Präzipitationslinien analysiert. Bei Anfärben der Platten mußte das überschüssige, nicht-präzipitierte Protein durch 2maliges Inkubieren der Platten in physiologischer NaCl-Lösung entfernt werden.

6.7.5. Immunfluoreszenz

Zur Testung der Kaninchenantisera sowie menschlicher Patientensera kam die indirekte Immunfluoreszenztechnik zur Anwendung. Ihr Prinzip ist vereinfacht folgendes: Spezifische Antikörper gegen Zellmembranantigene vermögen sich an diese selektiv anzulagern. An die gebundenen Antikörper können wiederum Antiantikörper gebunden werden, an die ein Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist. Damit wird indirekt das tumorspezifische Antigen sichtbar gemacht. Handelt es sich bei dem ersten Antikörper um den eines Kaninchens, muß ein Antikaninchenimmunglobulinserum verwendet werden. Bei Testen von Humanserum muß ein spezifisches Fluoreszenz-markiertes Antihuman-Immunglobulin verwendet werden, das meist von der Ziege oder vom Pferd gewonnen wird.

Zur Darstellung einer spezifischen Membranfluoreszenz bedarf es intakter Zellen, die entweder direkt aus dem Biopsiematerial oder über die Gewebekultur gewonnen werden. In letzterem Fall werden die Zellen dazu auf Glasdeckgläschen von Objektträgern gezüchtet.

Zur Fluoreszenzmarkierung wurden die Zellen 3mal mit PBS gewaschen und anschließend das zu testende Serum in geometrischer Verdünnung (1:2, 1:4, 1:8 und 1:16) auf die Glasdeckgläschen mit den Zellen pipettiert. Nach 30minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen 3mal mit PBS für je 10 min gespült und anschließend mit analo-

gen Verdünnungen des Fluoreszenzkonjugates (entweder FITC = Fluorescein-Isothiocyant oder Rhodamin) 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Konjugatserum wird anschließend durch wiederholtes Spülen mit PBS entfernt und schließlich das PBS durch einmaliges Waschen mit deionisiertem Wasser herausgelöst. Nach Lufttrocknen wird das Präparat in einem Leitz-Ortholux-Mikroskop untersucht. Als Lampe wurde eine Osram HBO 200 W verwendet. Filter wurden entsprechend einer möglichst schmalen Bandanregung und einer spezifischen Emission der Fluorochrome ausgewählt, wobei die Absorptionsmaxima von den FITC-Konjugaten bei 495 nm, die von den Rhodaminkonjugaten bei 560 nm lagen. Zur Testung nichtspezifischer Konjugatbindung wurden Kontrollen mit normalen Zellen mit und ohne Einwirkung von normalem Serum durchgeführt.

6.8. Elektronenmikroskopie

Die Präparation der Proben für die Elektronenmikroskopie erfolgte nach der von Miller (1960, 1964) beschriebenen Methodik. Dazu wurden die subzellulären Fraktionen und Membranpräparationen durch Zentrifugation in PBS saccharosefrei gewaschen und anschließend mit 2,5%igem Glutaraldehyd in 0.1 M Cacodylatpuffer, pH = 7.2, bei 2°C eine Stunde lang fixiert. Danach wurden die Proben 2mal mit 0.1 M Cacodylatpuffer gewaschen und anschließend mit 1%igem Osmiumtetroxyd in 0.1 M Cacodylatpuffer, pH = 7.2, nachfixiert. Anschließend wurde in einer Alkoholreihe (70%, 95% und 100%) entwässert. Die Einbettung erfolgte über Propylenoxyd in Epon 812 (Luft, 1960). Die lichtmikroskopischen Untersuchungen an Epon-einbetteten Zellkulturen erfolgte an semidicken Schnitten, um Areale mit genügend Zellen herauszufinden. Von diesen Be-

zirken wurden mit einem Diamantmesser an einem LKB-Ultratom III ultradünne Schnitte angefertigt und auf Kupfernetzen (200 mesh) aufgezogen. Die Nachkontrastierung erfolgte mit einer Magnesiumuranylazetatlösung (Frasca und Parks, 1965) und mit einer Bleiazetatlösung (Venable und Coggeshall, 1964). Die Schnitte wurden in einem Siemens Elmiskop I A oder 102 bei einer Stromspannung von 80 kV und einer 50 μ -Objektivblende untersucht. Aufnahmen wurden in einem Vergrößerungsbereich von 6.000 bis 40.000 angefertigt.

7. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- 1 Aleksandrowicz, V. und Skotnicki, A.B. *The role of the thymus and thymic humoral factors in immunotherapy of aplastic and proliferation disease of the hemopoietic systems.* *Acta Med. Pol.* 17, 1-17 (1976)
- 2 Amery, W. *Immunopotential with levamisole in resectable bronchogenic carcinoma: a double-blind controlled trial.* *Brit. Med. J.* 3, 461-464 (1975)
- 3 Anon *Possibility of immunodiagnosis in ovarian cancer.* *Chin. Med. J.* 4 (3), 185-190 (1978)
- 4 Beers, R.F. und Braun, W. *Biological effects of polynucleotides.* Springer Verlag, N.Y. (1971)
- 5 Berd, D. und Prehn, R.T. *Peritoneal macrophage response to leukemia L 1210 in syngeneic mice.* *J. Natl. Cancer Inst.* 58, 1729 (1977)
- 6 Besedovsky, H. und Sorkin, E. *Hormonal control of immune response.* *Endocrinology* 2, 504-513 (1977a)
- 7 Besedovsky, H. und Sorkin, E. *Network of immune-neuroendocrine interactions.* *Clin. exp. Immunology* 27, 1-12 (1977b)
- 8 Birmayer, G.D., Balda, B.-R. und Miller, F. *The inhibitory effect of proflavin and ethidiumbromide on the cell-free transmission and the growth of the hamster melanoma A-Mel 3.* *Europ. J. Cancer* 9, 859-864 (1973)
- 9 Birmayer, G.D., Balda, B.-R. und Miller, F. *Oncorna-viral information in human melanoma.* *Europ. J. Cancer* 10, 419-424 (1974a)
- 10 Birmayer, G.D., Miller, F. und Marguth, F. *Oncorna-viral information in human glioblastoma.* *J. Neural Transmission* 35, 241-254 (1974b)
- 11 Birmayer, G.D., Hammer, C., Eberhard, H.D. und Brendel, W. *A tumor-specific antigen associated with reverse transcriptase in human melanoma.* in: *Int. Symp. "Immunological Reactions to melanoma Ag"*. Hannover 1975, Behring-Inst. Mitteilungen 56, 107-115 (1975)
- 12 Birmayer, G.D., Lubitz, W., Hammer, C., Eberhard, H.E., Tichmann, I., Chaussy, C. und Brendel, W. *Biochemical and immunological evidence for oncorna viral features in human melanoma, glioblastoma and leukemia.* in: *E. Deutsch, K. Moser, H. Rainer und A. Stacher: Molecular Base of Malignancy*; Georg Thieme, Stuttgart, p. 197-204 (1976)

- 13 Birmayer, G.D. *Neue immunologische Aspekte bei menschlichen Gliomen.*
Current Topics Neuropath. 4, 7-13 (1977)
- 14 Birmayer, G.D.,
Lubitsz, W.,
Tichmann, I.,
Hammer, C. und
Eberhard, H.E. *Antibodies against reverse transcriptase as a diagnostic tool in human cancer.*
in: H.E. Nieburgs: *Prevention and Detection of Cancer; Part II, Vol. 1*,
p. 753-765 (1978)
- 15 Black, M.M.,
Zachrau, R.E.
und Shore, B. *Biological considerations of tumor-specific and virus-associated antigens.*
Cancer Res. 36, 769-774 (1976)
- 16 Bowen, J.M.,
Allen, P.T.,
East, J.L.,
Maruyama, K.,
Newton, W.A.,
Georgiades, J.,
Priori, E.S. und
Dmochowski, L. *Molecular probes in studies of the relationship of viruses in human neoplasia.*
Am. J. clin. Path. 60, 88-99 (1973)
- 17 Boyse, E.A.,
Stockert, E. und
Old, L.J. *Modification of the antigenic structure of the cell membrane by thymus-leukemia (TL) antibody.*
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 58, 984-957 (1967)
- 18 Brandis, H. *Einführung in die Immunologie.*
Gustav Fischer, S. 140-144 (1975)
- 19 Brannen, G.E.,
Gomolka, D.M. und
Coffey, D.S. *Specificity of cell membrane antigens in prostatic cancer.*
Cancer Chemother. Rep. 59, 127-138 (1975)
- 20 Brooks, W.H.,
Roszman, T.L.,
Mahaley, M.S. und
Woosley, R.E. *Immunobiology of primary intracranial tumours. II. Analysis of lymphocyte subpopulations in patients with primary brain tumours.*
Clin. Exp. Immunol. 29 (1), 61-66 (1977)
- 21 Budzynski, W. und
Radzikowski, C. *A common tumour antigen appearing in various human tumours.*
Postepy Hig.Med.Dosw. 31 (4) 453-463 (1977)
- 22 Burkitt, D. *In treatment of Burkitt's tumour.*
p. 197, N.Y.: Springer-Verlag (1967)
- 23 Burnet, F.M. *Carcinogenesis: Mechanisms of action.*
Little, Brown, Boston (1973)
- 24 Caspary, E.A. und
Field, E.J. *Specific lymphocyte sensitisation in cancer. Is there a common antigen in human malignant neoplasia?*
Brit. Med. J. 2 613-615 (1971)

- 25 Coakham, H. Surface antigen(s) common to human astrocytoma cells.
Nature 250, 328-330 (1974)
- 26 Coggins, J.H., Ambrose, K.R., Dierlam, P.J. und Anderson, N.G. Proposed mechanisms by which autochthonous neoplasms escape immune rejection.
Cancer Res. 34, 2092 (1974)
- 27 Cuatrecasas, W., Cho, J.-R. und Spiegelman, S. Particles with RNA of high molecular weight and RNA-directed DNA polymerase in human brain tumors.
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 70, 2789-2793 (1973)
- 28 Currie, G.A. und Bagshawe, K.D. The role of sialic acid in antigenic expression: Further studies of the Landschütz ascites tumour.
Brit. J. Cancer 22, 843 (1968)
- 29 DeCarvalho, S. Preliminary experimentation with specific immunotherapy of neoplastic disease in man. I. Immediate effects of hyperimmune equine gammaglobulins.
Cancer 16, 306-330 (1962)
- 30 Deinhardt, F. Induction of tumors in marmoset monkey with ST -feline fibrosarcoma virus.
Comp. Leuk. Res. 1, 401 (1970)
- 31 Dickinson, J.P. Tumour-specific antigen (Meeting Abstract)
Scand. J. Immunol. 6 (11), 1172-1173, (1977)
- 32 Dmochowski, L. und Horoszewicz, J.S. Viral oncology of prostatic cancer
Seminars in Oncology, Vol. 3, 141-150 (1976)
- 33 Donaldson, R.C. Methotrexate plus Bacillus Calmette- Guerin (BCG) and isoinazid in the treatment of cancer of the head and neck.
Am. J. Surg. 124, 527 (1972)
- 34 Dumonde, D.C. The effects of antibodies on cells. 3. Studies on the interaction of rat liver mitochondria and lysosomes with antibody and complement.
Immunology 9, 177-191 (1966)
- 35 Eagle, H. Amino acid metabolism in mammalian cell cultures.
Science 130, 432 (1959)
- 36 Eccles, S.A. und Alexander, P. Macrophage content of tumours in relation to metastatic spread and host immune reaction.
Nature 250, 667 (1974)

- 37 Edgington, T.S.,
Astarita, R.W. und
Flow, E.T. Association of an isomeric species of
carcino embryonic antigen with neo-
plasia of the gastrointestinal tract.
New Engl. J. Med. 293, 103-109 (1975)
- 38 Eidinger, D. und
Morales, A. Treatment of superficial bladder cancer
in man.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 277, 239-240 (1976)
- 39 Eilber, F.R. Adjuvant immunotherapy with BCG in treat-
ment of regional lymphnode metastases
from malignant melanoma.
N. Eng. J. Med. 294, 237-240 (1976)
- 40 Eilber, F.R. und
Morton, D.L. Etiology of human skeletal and soft
tissue sarcomas: A summary of immunologic
and virologic studies.
in: *Bones & Joints* (Baltimore: Williams
& Wilkins Co.): IAP Monograph No. 17;
pp. 187-195 (1976)
- 41 Everson, T.C. und
Cole, W.H. Spontaneous regression of cancer.
Philadelphia (1966)
- 42 Fass, L. Evaluation of the effect of remission
plasma on untreated patients with Bur-
kitt's lymphoma.
J. Natl. Cancer Inst. 44, 145-149 (1970)
- 43 Faulconer, R.J.,
Rosato, F.E.,
Wright, G.L. und
Schellhammer, P. Detection and isolation of antigens
associated with renal cell carcinoma
(Meeting Abstract).
Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 19, 308
(1978)
- 44 Fogh, J. Human tumor cells in vitro.
Plenum Press, N.Y. & Lond. (1975)
- 45 Folkman, J. Tumor Angiogenesis.
in: F.F. Becker "Cancer" Vol. IV,
pp. 355-388, Plenum Press N.Y. & Lond.
(1975)
- 46 Franchimont, P. Cancer related antigens.
North Holland, Amsterdam (1976)
- 47 Frasca, J.M. und
Parks, V.R. A routine technique for double-staining
ultrathin sections using uranyl and lead
salts.
J. Cell Biol. 25, 157-160 (1965)
- 48 Friend, C.J. Cell-free transmission in adult swiss mice
of a disease having the character of a
leucemia.
J. exp. Med. 105, 307 (1957)

- 49 Gallagher, R.E. und Gallo, R.C. Type C-RNA tumor virus isolated from cultured human acute myelogenous leukemia cells. *Science* 187, 350-353 (1975)
- 50 Gerner, R.E. und Moore, G.E. Feasibility study of active immunotherapy in patients with solid tumors. *Cancer* 38, 131-143 (1976)
- 51 Ghose, T. Immunotherapy of cancer with chloramubucil-carrying antibody. *Brit. Med. J.* 3, 495-499 (1972)
- 52 Glöck, M.C. Cell surface changes associated with malignancy. In: *Fundamental Aspects of Metastasis*; Weiss, L., ed. (Amsterdam:North Holland Publishing Co.):pp.9-23 (1976)
- 53 Götz, H. 3. Tumorspezifische Transplantationsantigene: TSTA In: "Antigenität von Tumorproteinen" De Gruyter Verlag Berlin, S. 76-122 (1972)
- 54 Gold, P. und Freeman, S.O. Specific carcinoembryonic antigens of the human digestion tract system. *J. Exp. Med.* 122, 467-481 (1965)
- 55 Goodnight, J.E. und Morton, D.L. Immunotherapy for malignant disease. *Ann. Rev. Med.* 29, 231-283 (1978)
- 56 Gorski, Y., Vanky, F. und Sulitzeanu, D. Isolation from patients with breast cancer of antibodies specific for antigens associated with breast cancer and other malignant diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 73, 2101-2105 (1976)
- 57 Gorski, Y., Vanky, F. und Sulitzeanu, D. Isolation from patients with breast cancer of antibodies specific for antigens associated with breast cancer and other malignant diseases (Meeting Abstract). *Isr. J. Med. Sci.* 12 (10), 1242-1243 (1976)
- 58 Gozzo, J.J., Gottschalk, R., O'Brien, P., Cronin, W. und Monaco, A.P. Use of heterogenous and monospecific antisera for the diagnosis of bladder cancer. *J. Urol.* 118 (5), 748-751 (1977)
- 59 Graffi, A. Chloroleukemia in mice. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 68, 540-558 (1957)

- 60 Green, A.A. *Immunotherapy of osteosarcoma patients with virus-modified tumor cells.*
Ann. N.Y. Acad. Sci. 277, 346-410 (1976)
- 61 Griffen, W.O., Jr. *Colon carcinoma and immunologic phenomena.*
Surg. Clin. North Am. 52, 839-845 (1972)
- 62 Gross, L. *Pathogenic properties and "vertical" transmission of the mouse leukemia agent.*
Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. 78, 342-348 (1951)
- 63 Gupta, R.K. und Morton, D.L. *Distribution of antibodies to common tumor-associated antigen(s) in cancer and non-cancer sera.*
Oncology Abstr. 2, Nr. 1J9494 (1978)
- 64 Gutterman, J.U. *Chemoimmunotherapy of adult acute leukaemia: prolongation of remission in myeloblastic leukaemia with BCG.*
Lancet 2, 1405-1409 (1974)
- 65 Gutterman, J.U. *Immunotherapy of breast cancer, malignant melanoma and acute leukemia with BCG: prolongation of disease-free interval and survival.*
Cancer Immunol. Immunother. 1, 99-107 (1976)
- 66 Gutterman, J.U., Mavligit, G.M., Schwarz, M.A. und Hersch, E.M. *Immunotherapy of human solid tumours: principles of development.*
in: E. Castro: "Immunological Aspects of Cancer" MTP Press United Lancaster England, pp. 417-470 (1978)
- 67 Hadden, J.W. *Suppressor cells.*
Clin. Bull. 7 (1), 29-33 (1977)
- 68 Haywood, G.R. und McKhann, C.F. *Antigenic specificities murine sarcoma cells. Reciprocal relationships between normal transplantation antigens (H-2) and tumor-specific immunogenicity.*
J. exp. Med. 133, 1171 (1971)
- 69 Hellström, I., Hellström, K.E. und Evans, C.A. *Serum-mediated protection of neoplastic cells from inhibition by lymphocytes immune to their tumor-specific antigens.*
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 62, 362-368 (1969)

- 70 Hellström, K.E. und Hellström, I. Immunity to nemoblastomas and melanomas.
Ann. Rev. Med. 23, 19 (1972)
- 71 Hellström, I., Warner, G.A., Hellström, K.E. und Sjögren, H.O. Sequential studies on cell-mediated tumor immunity and blocking serum activity in ten patients with malignant melanoma.
Int. J. Cancer 11, 280 (1973)
- 72 Herberman, R.B. Immunologic tests in diagnosis of cancer.
Am. J. Clin. Pathol. 68, 688-698 (1977)
- 73 Herr, H.W. 1. Immunobiology of human bladder cancer.
J. Urol. 115, 147-149 (1976)
- 74 Hollinshead, A.C., Jaffurs, W.T., Alpert, L.K., Harris, J.E. und Herberman, R.B. Isolation and identification of soluble skin-reactive membrane antigens of malignant and normal human breast cells.
Cancer Res. 34, 2961-2968 (1974)
- 75 Huebner, R.J., Gilden, R.V., Lane, W.T., Toni, A., Trimmer, R.W. und Hill, P.R. Suppression of murine type-C RNA virogenes by type-specific oncornavirus-vaccines: Prospects for prevention of cancer.
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 73, 620-624 (1976)
- 76 Hunsmann, G., Moenning, V. und Schäfer, W. Properties of mouse leukemia viruses. IX. Active and passive immunization of mice against Friend leukemia with isolated GP 71 glycoprotein and its corresponding antiserum.
Virology 66, 327-329 (1975)
- 77 Hunter-Craig, I. Use of vaccinia virus in the treatment of metastatic malignant melanoma.
Brit. Med. J. 2, 512-515 (1970)
- 78 Israel, L. und Edelstein, R. Immunological aspects of neoplasia. pp. 485-504, Baltimore: Williams & Wilkins (1975)
- 79 Jaenisch, R., Berns, A., Dausman, J. und Cox, V. Germ line integration and leukemogenesis of exogenous and endogenous murine leukemia viruses.
Cell.Biol. 4, 283-310 (1976)

- 80 Jenssen, H.L.,
Werner, H.,
Kohler, H.,
Seyfarth, M. und
Friemel, H.
A new general tumor antigen for the immunological diagnosis of malignancy.
Dtsch. Gesundheitsw. 32, 1061-1063 (1977)
- 81 Jerne, N.K.
Cellular selection and regulation in the immune response.
in: G.M. Edelman, Ravens Press N.Y. (1974)
- 82 Jerne, N.K.
Antigen-dependent immunoregulation. The Harvey lectures Academic Press, N.Y. (1975)
- 83 Jewell, W.R.
Critical analysis of treatment of stage II and stage III melanoma patients with immunotherapy.
Ann. Surg. 183, 543-549 (1976)
- 84 Jones, S.E. und
Salmon, S.E.
Adjuvant therapy of cancer.
pp. 549-556; Amsterdam:North Holland (1977)
- 85 Kamine, J.,
Burr, J.G. und
Buchanan, J.M.
Multiple forms of sarc gene proteins from rous sarcoma virus RNA.
Proc.Natl.Acad.Sci. (USA) 75(1), 366-370 (1978)
- 86 Kast, R.E.
Interpretation of the common tumour antigen (CTA)-an antigen present on all human malignant tumour cells and suspected of mediating malignant growth of cells.
Arch. Geschwulstforsch. 47(3), 251-258 (1977)
- 87 Kast, R.E.
Radiodiagnostic and radiotherapeutic implications of the recent discovery of a common malignant tumour antigen, CTA, absolutely unique to cancer cells.
Radiobiol.Radiother. 18(4), 536-544 (1977)
- 88 Kawakami, T.,
Huff, S.D.,
Buckley, P.M.,
Dungworth, O.L.,
Snyder, S.P. und
Gilden, R.V.
C-type virus associated with gibbon lymphosarcoma.
Nature New Biol. 235, 170 (1972)
- 89 Kay, H.
Acute lymphoblastic leukemia: 5 year follow-up of the concord trial.
in: W.D. Terry & D. Windhorst "Immunotherapy of Cancer:Present Status of Trials in Man."
Raven Press, N.Y., 493-496 (1978)

- 90 Kellen, J.A. und
Lo, J.S. *Localization of ¹²⁵J labelled antibodies against tumor-associated proteins from experimental rat mammary neoplasm. Res. Comm. Chem. Path. Pharm.* 5, 411 (1973)
- 91 Khan, A.S.,
Essex, M.,
Sliski, A.H. und
Stephenson, J.R. *Identification of a transformation-specific feline sarcoma virus-coded protein (Meeting Abstract).*
J. Supramol. Struct. (Suppl. 2)
256 (1978)
- 92 Kumanishi, T. und
Yamamoto, T. *Brain tumors induced with Rous sarcoma virus, Schmidt-Ruppin strain. 2. Rous tumor specific transplantation antigen in subcutaneously passaged mouse brain tumors. Jap. J. Exp. Med.* 40, 79-86 (1970)
- 93 Laszlo, J. *Infusion of isologous immune plasma in chronic lymphocytic leukemia. Blood* 31, 104-110 (1968)
- 94 Levin, A.S. *Osteogenic sarcoma: immunologic parameters before and during immunotherapy with tumorspecific transfer factor. J. Clin. Invest.* 55, 487-499 (1975)
- 95 Lewis, M.G. *Immunology and the melanomas. In: Current Topics in Microbiology* 63, 49 (1974)
- 96 LoBuglio, A.F. und
Neidhardt, J.A. *A review of transfer factor immunotherapy in cancer. Cancer* 34, 1563 (1974)
- 97 Lopez, M.J. und
Thomson, D.M.P. *Isolation of breast cancer tumour antigen from serum and urine. Int. J. Cancer* 20, 834-848 (1977)
- 98 Luft, J.H. *Improvements in epoxy resin embedding methods. J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9, 409-414 (1961)
- 99 Mak, T.W.,
Kurtz, S.,
Manaster, J. und
Hausman, D. *Viral-related information in oncorna virus-like particles isolated from cultures of marrow cells from leukemic patients in relapse and remission. PNAS* 72, 623 (1975)
- 100 Marcove, R.C. *A clinical trial of autogenous vaccine in osteogenic sarcoma in patients under the age of twenty five. Surg. Forum* 22, 434-435 (1971)

- 101 Marsh, B. *Immunologic aspects of osteosarcoma and their application to therapy.*
J. Bone Surg. 54A, 1367-1397 (1972)
- 102 Mathe, G. *Active immunotherapy for acute lymphoblastic leukemia.*
Lancet 1, 697-699 (1969)
- 103 Mavligit, G.M. *Prolongation of postoperative disease-free interval and survival in human colorectal cancer by BCG or BCG plus 5-fluorouracil.*
- 104 Mayr, A.,
Bachmann, P.A.,
Bibrach, B. und
Wittmann, G. *Virologische Arbeitsmethoden.*
Gustav Fischer Verlag Stuttgart (1974)
- 105 McAllister, R.A.,
Filbert, J.E.,
Nickolson, M.O.,
Rongey, R.W.,
Gardner, M.B.,
Gilden, R.V. und
Huebner, R.J. *Transformation and productive infection of human osteosarcoma cells by a feline sarcoma virus.*
Nature 230, 279 (1971)
- 106 McDevitt,
Landy, M. *Genetic control of immune responsiveness.*
Academic Press, N.Y. London (1972)
- 107 McKneally, M.F. *Regional immunotherapy of lung cancer with intrapleural BCG.*
Lancet 1, 377-379 (1976)
- 108 Medawar, P.B. *Immunological tolerance.*
Science 133, 303 (1961)
- 109 Merrin, C.,
Han, T.,
Klein, E.,
Wasjzman, Z. und
Murphy, P. *Immunotherapy of prostatic carcinoma with bacillus Calmette-Guerin.*
Cancer Chemotherapy Rep. 59, 157 (1975)
- 110 Mesa-Tejada, R.,
Keydar, I.,
Ramanarayanan, M.,
Ohno, T.,
Fenoglio, C. und
Spiegelman, S. *Detection in human breast carcinomas of an antigen immunologically related to a group-specific antigen of mouse mammary tumor virus.*
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 75, 1529-1533 (1978)
- 111 Metzgar, R.S. und
Mohanakumar, T. *Tumor-associated antigens of human leukemia cells.*
Semin. Hematol. 15(2), 139-156 (1978)
- 112 Mihas, A.A. *Immunologic studies on a pancreatic oncofetal protein.*
J. Natl. Cancer Inst. 60(6), 1439-1444 (1978)

- 113 Miller, F. Hemoglobin absorption by the cells of the proximal convoluted tubule in mouse kidney.
J. Biophys. Biochem. Cytol. 8, 689-718 (1960)
- 114 Miller, F. und Palade, G.E. Lytic activities in renal protein absorption droplets. An electron microscopical cytochemical study.
J. Cell Biol. 23, 519-552 (1964)
- 115 Milton, G.W. und Lane-Brown, M.M. The limited role of attenuated smallpox virus in the management of advanced malignant melanoma.
Aust. NZJ. Surg. 35, 286-290 (1966)
- 116 Monod, J. Zufall und Notwendigkeit
Piper Verlag München (1971)
- 117 Moore, G.E., Gerner, R.E. und Franklin, H.A. Culture of normal human leucocytes.
J.A.M.A. 199, 519-524 (1967)
- 118 Morales, A. und Eidinger, D. *Bacillus Calmette-Guerin* in the treatment of adenocarcinoma of kidney.
J. Virol. 115, 377 (1976)
- 119 Morgan, J.F., Morton, H.J. und Parker, R.C. Nutrition of animal cells in tissue culture. I. Initial studies on a synthetic medium.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 73, 1-8 (1950)
- 120 Morton, D.L. und Malmgren, R.A. Human osteosarcomas - Immunological evidence suggesting an associated infectious agent.
Science 162, 1279-1281 (1968)
- 121 Morton, D.L. Immunological factors which influence response to immunotherapy in malignant melanoma.
Surgery 68, 158-164 (1970)
- 122 Morton, D.L. und Malmgren, R.A. Human liposarcomas - Tissue culture containing foci of transformed cells with viral particles.
Science 165, 813-816 (1969)
- 123 Mühlboeck, O. und Bentvelzen, P. The transmission of mammary tumor viruses.
Perspect. Virol. 6, 75 (1969)
- 124 Nadler, S.H. und Moore, G.E. Immunotherapy of malignant disease.
Arch. Surg. 99, 376-381 (1969)
- 125 Nagel, G.A. und Geiger, C. Krebs und Immunität
Schweizer Med. Wschr. 101, 1605 (1971)

- 126 Nathanson, L. *Regression of intradermal malignant melanoma after intralesional injection of mycobacterium bovis strain BCG.*
Cancer Chemother. Rep. 56, 659-665 (1972)
- 127 Ngu, V.A. *Treatment of Burkitt's tumour.*
in: Burkitt, D. N.Y. Springer-Verlag (1967)
- 128 Nooter, K.,
Aarssen, A.M.,
Bentvelzen, P.,
DeGroot, F.G. und
Van Pelt, F.G. *Isolation of infectious C-type oncornavirus from human leukemic bone marrow cells.*
Nature 256, 595-597 (1975)
- 129 Normann, S.J.,
Schardt, M. und
Sorkin, E. *Do tumor escape surveillance by depression of macrophage inflammation?*
in: K.James, B.McBride, A.Stuart: "The Macrophage and Cancer"
University of Edinburg, p.247-257 (1977)
- 130 Oettgen, H.F. *Effects of dialyzable transfer factor in patients with breast cancer.*
Proc. Natl.Acad.Sci.(USA) 71, 2319-2323 (1974)
- 131 Old, L.J.,
Stockert, E.,
Boyse, E.A. und
Kim, J.H. *Antigenic modulation. Loss of TL antigen from cells exposed to TL antibody. Study of the phenomenon in vitro.*
J. exp. Med. 127, 523 (1968)
- 132 Ostrand-Rosenberg, S.,
Edidin, M.,
Jewett, M.A.S. *Human teratoma cells share antigens with mouse teratoma cells.*
Dev.Biol. 61, 11-19 (1977)
- 133 Otten, J. *Immunotherapy versus chemotherapy as maintenance treatment of acute lymphoblastic leukemia.*
in: W.D. Terry & D. Windhorst, N.Y. Raven Press, 471-483 (1978)
"Immunotherapy of Cancer: Present status of man"
- 134 Ouchterlony, O. *Diffusion in gel methods for immunological analysis.*
Progr. Allerg. 5, 1 (1958)
- 135 Parsons, P.G.,
Gross, P. und
Pope, J.H. *Detection in human melanoma cell lines of particles with some properties in common with RNA tumour viruses.*
Int. J. Cancer 13, 606-618 (1974)

- 136 Paul, J. *Cell and tissue culture.*
Elsevier, Amsterdam (1965)
- 137 Pike, M.C. und Snyderman, R. *Depression of macrophage function by a factor produced by neoplasms: a mechanism for abrogation of immune surveillance.*
J. Immunol. 117, 1243-1249 (1976)
- 138 Pines, A. *A 5 year controlled study of BCG and radiotherapy for inoperable lung cancer.*
Lancet 1, 380-381 (1976)
- 139 Pinsky, C.M. *Treatment of malignant melanoma by intratumoral injection of BCG.*
Natl. Cancer Inst. Monogr. 39, 225-228 (1973)
- 140 Pinsky, C.M. *Surgical adjuvant immunotherapy with BCG in patients with malignant melanoma: Results of a prospective, randomized trial.*
in: W.D. Terry & D. Windhorst, ed. *"Immunotherapy of Cancer. Present Status of Trials in Man"*.
N.Y. Raven Press , pp.27-35 (1978)
- 141 Pohl, P. *Zur Therapie der strahlenbedingten Leukopenie mit Exberitor^R.*
Med.Klin. 64, 1546-1547 (1969)
- 142 Powles, R.L. *Immunotherapy for acute myelogenous leukemia.*
Brit. J. Cancer 28, 365-376 (1973)
- 143 Pritchard, D.J., Reilly, C.A. und Finkel, M.P. *Evidence for human osteosarcoma virus.*
Nature 234, 126-127 (1971)
- 144 Raff, M. *Self regulation of membrane receptors.*
Nature 259, 265 (1976)
- 145 Ramming, K.P. und deKernion, J.B. *Immune RNA therapy for renal cell carcinoma: survival and immunologic monitoring.*
Ann. Surg. In press (1977)
- 146 Ramming, K.P. *Handbook of cancer and immunology.*
Washington, Inst. Press. In press (1977)
- 147 Reizenstein, P. *Analysis of a controlled clinical study 2 1/2 years after entry of the last patient.*
in: W.D. Terry & D. Windhorst, ed. *"Immunotherapy of Cancer: Present status of trials in man."*
Raven N.Y. 329-341 (1978)

- 148 Richman, S.P.,
Livingston, R.B.,
v.Gutterman, J.,
Sven, J.Y. und
Hersh, E.M. Chemotherapy versus chemoimmuno-
therapy of head and neck cancer re-
port of a randomized study.
Cancer Treat. Rep. 60, 535 (1976)
- 149 Rochman, H.,
deGroot, L.J.,
Rieger, C.H.J.,
Varnavides, L.A.,
Refetoff, S.,
Joung, J.I. und
Hoye, K. Carcinoembryonic antigen and humo-
ral antibody response in patients
with thyroid carcinoma.
Cancer Res. 35, 2689 (1975)
- 150 Rojas, A.F.und
Feierstein, J.N. Levamisole in advanced human breast
cancer.
Lancet 1, 211-215 (1976)
- 151 Sanford, B.H. An alteration in tumor histo-
compatibility induced by neuramini-
dase.
Transplantation 5, 1273-1279 (1967)
- 152 Schultz, R.M.,
Papamatheakis, J.D.
und Chirigos, M.A. Interferon: an inducer of macro-
phage activation by polyanions.
Science 197, 674-676 (1977)
- 153 Schwarzenberg, L. Attempted adoptive immunotherapy
of acute leukaemia by leucocyte
transfusions.
Lancet 2, 365-368 (1966)
- 154 Seigler, H.F. Nonspecific and specific immuno-
therapy in patients with melanoma.
Surgery 72, 162-174 (1972)
- 155 Sharma, B. In vitro immunization to human
tumor cells with tumor cell frac-
tions.
Oncology Abstr. 2, Nr.1J9763 (1978)
- 156 Sjögren, H.O.,
Hellström, I.,
Bansal, S.C. und
Hellström, K.E. Suggestive evidence that the
"blocking antibodies" of tumor-
bearing individuals may be anti-
gen-antibody complexes.
PNAS 68, 1372-1375 (1971)
- 157 Skinner, D.G. Advanced renal cell carcinoma:
treatment with xenogeneic immune
ribonucleic acid and appropriate
surgical resection.
J. Urol. 115, 246-250 (1976)

- 158 Skurkovich, S.V. Treatment of children with acute leukemia by passive cyclic immunization with autoplasm and auto-leukocytes operated during the remission period.
Blood 33, 186-197 (1969)
- 159 Smalley, J.R. and Bystryn, J.C. Purification of a cell-surface glycoprotein from human melanoma (Meeting Abstract)
Fed.Proc. 37, 1595 (1978)
- 160 Snell, G.D. The homograft reaction.
Ann. Rev. Microbiol. 11, 439 (1957)
- 161 Snyder, S.P. und Theilen, G.H. Transmissible feline fibrosarcoma.
Nature 221, 1074 (1969)
- 162 Sokal, J.E. Immunotherapy in well-controlled chronic myelocytic leukemia.
N.Y. State J.Med. 73, 1180-1185 (1973)
- 163 Sokal, J.E. Delay in progression of malignant lymphoma after BCG vaccination.
N.Engl.J.Med. 291, 1226-1230 (1974)
- 164 Spiegelman, S., Kufe, D., Hehlmann, R. und Peters, W.P. Evidence for RNA tumor viruses in human lymphomas including Burkitt's disease.
Cancer Res. 33, 1515-1526 (1973)
- 165 Springer, T.A., Mann, D.L., DeFranco, A.L. und Strominger, J.L. Detergent solubilization, purification, and separation of specific of HLA antigens from a cultured human lymphoblastoid line, RPMI 4265.
J.Biol.Chem. 252, 4682-4693 (1977)
- 166 Stutman, O. Immunodepression and malignancy.
Adv. Cancer Res. 22, 261-422 (1975)
- 167 Sumner, W.C. and Foraker, A.G. Spontaneous regression of human melanoma: clinical and experimental studies.
Cancer 13, 79-81 (1966)
- 168 Sutherland, C.M., Hornung, M.O. und Klementz, E.T. Chimpanzee transfer factor for human malignant melanoma.
Oncology Abstr. 2, Nr.1J10330 (1978)
- 169 Suzuki, T., Katano, A., Oboshi, S., Sairenji, T. und Hinuma, Y. Epstein-Barr virus-determined nuclear antigen in malignant epithelial cells of nasopharyngeal carcinoma.
Gann 69, 133-138 (1978)

- 170 Tatarinov, Y.S. *Detection of embryo-specific - globulin in the blood sera of patients with primary liver tumors. Vop.Med.Khim.* 10, 90 (1964)
- 171 Temin, H.M. und Mizutani, M.S. *RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. Nature* 226, 1211-1213 (1970)
- 172 Thomson, D.M.P., Rauch, J.E., Weatherhead, J.C., Friedlander, P., O'Connor, R., Grosser, N., Shuster, J. und Gold, P. *Isolation of human tumour-specific antigens associated with β_2 microglobulin. Br.J.Cancer* 37, 753-775 (1978)
- 173 Todaro, G.J. und Huebner, R.J. *The viral oncogene hypothesis: New evidence. PNAS* 69, 1009-1015 (1972)
- 174 Turowski, G. *First trials of immunopotential by thymus extract (TFX) in surgical patients with malignant disease. Acta Med. Pol.* 17, 19-39 (1976)
- 175 Tykkä, H., Oravisto, K.J., Lehtonen, T., Sarna, S. und Tallberg, T. *Active specific immunotherapy of advanced renal-cell carcinom. Eur. Virol.* 4, 250-258 (1978)
- 176 Venable, J.H. und Coggeshall, R. *A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. J. Cell Biol.* 25, 407-408 (1965)
- 177 Viza, D., Phillips, S. und Boucheix, C. *Associated tumour antigens in leukemia, melanoma and lung carcinoma. in: P. Franchimont: "Cancer related antigens" pp. 77-92; North Holland, Amsterdam (1976)*
- 178 Vogler, W.R. *Prolonging remission in myeloblastic leukemia by tice strain Bacillus Calmette Guerin. Lancet* 2, 128-131 (1974)
- 179 Wahlström, T., Linder, E., Sakela, E. und Westermarck, B. *Tumor-specific membrane antigens in established cell lines from gliomas. Cancer* 34, 274-279 (1974)

- 180 Warnatz, H. Tumorimmunologie.
Georg Thieme Verlag Stuttgart
(1975)
- 181 Warren, L. und
Glück, M.C. Isolation of surface membranes of
tissue culture cells. B. Zinc ion
method.
in: "Fundamental Techniques in
Virology"; (K.Habel & M.P. Salzman,
Acad. Press); pp.66-71 (1969)
- 182 Watson, R.D.,
Smith, A.G. und
Levy, J.G. The detection by immunodiffusion
of tumour associated antigenic
components in extracts of human
bronchogenic carcinoma.
Brit. J. Cancer 32, 300 (1975)
- 183 Wikstrand, C.J.,
Mahaley, M.S., Jr. und
Bigner, D.D. Common surface antigen(s) (HGL) of
human glial brain tumor (HGBT)
cells.
- 184 Weiss, R. Has the SRC gene product been found?
Nature 269, 287 (1977)
- 185 Whittaker, J.A. Immunotherapy of acute myelogenous
leukemia using intravenous BCG.
in: "Immunotherapy of Cancer": Pre-
sent status of trials in man.
(W.O. Terry & D. Windhorst, ed.)
Raven N.Y., 393-405 (1978)
- 186 Windhorst, D. International registry of tumor
immunotherapy.
Med.Clin.North.Amer. 60, 641-648
(1976)
- 187 Wood, G.W. und
Gillespie, G.Y. Receptor sites for antigen-anti-
body complexes on cells derived
from solid tumors: detection by
means of antibody sensitized sheep
erythrocytes labelled with tech-
netium - 99 m
J. Immunol. 114(3), 950-957 (1975)

D a n k

Herrn Professor Dr. Dr.h.c. Walter Brendel möchte ich für die Initiierung und Aktivierung der Zusammenarbeit mit der tumorimmunologischen Arbeitsgruppe seines Institutes herzlich danken.

Herrn Priv. Doz. Dr. med. Dr. med.vet. Claus Hammer bin ich zu besonderem Dank verpflichtet, weil er nicht nur einen Großteil des Melanommaterials für die Experimente zur Verfügung stellte, sondern durch persönliche und experimentelle Unterstützung einen Teil der Untersuchungen erst ermöglichte.

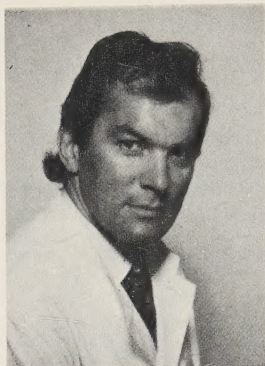
Herrn Prof. Dr. Frank Marguth (Direktor der Neurochirurgischen Klinik der Universität München) und seinen Mitarbeitern, Herrn Priv. Doz. Dr. R. Fahlbusch und Dr. H.P. Stass, danke ich für die Bereitstellung des Hauptkontingentes an Gliomen.

Auch dem Direktor der Urologischen Klinik der Universität München, Herrn Prof. Dr. Egbert Schmiedt, sowie seinem Oberarzt, Herrn Priv. Doz. Dr. G. Stähler, und seinem Mitarbeiter, Herrn Dr. W. Wieland, bin ich für die Kooperation auf dem Gebiet der Nierenkarzinome sehr dankbar.

Dem Vorstand des Institutes für Zellbiologie, Herrn Prof. Dr. Fritz Miller, bin ich für die Möglichkeit, in seinem Institut Teile dieser Arbeit durchzuführen, zu Dank verpflichtet.

Besonderer Dank gebührt Frau Ursula Vavro, Frau Eva-Maria Praetorius und Frau Anneliese Reichert für die experimentellen und technischen Hilfen sowie Frau Regina Schmitt diel für die Korrektur des Manuskriptes.

An dieser Stelle erlaube ich mir auch, all meinen Lehrern im klinischen Studienabschnitt zu danken, allen voran Herrn Prof. Dr. Eberhard Buchborn (Direktor der Medizinischen Klinik Innenstadt der Universität München), Herrn Prof. Dr. Fritz Holle (Direktor der Chirurgischen Poliklinik der Universität München) sowie Herrn Prof. Dr. Egbert Schmiedt (Direktor der Urologischen Klinik der Universität München), an deren Klinik ich mein Praktisches Jahr absolvieren durfte.



J ö r g G . D . B I R K M A Y E R

- 30.1. 1941 Geboren in Wien als 3. Kind des Neurologen und Psychiaters, Professor Dr. Walther Birkmayer, und seiner Frau Anna, geb. Besler.
- 1946 - 1959 Volksschule und Realgymnasium in Wien
Reifeprüfung abgelegt am 8.6.1959.
- 1959 - 1965 Studium der Chemie und Physik an der Universität Wien;
- Sommer 1963 Studienaufenthalt in Oxford und Manchester
- Juni 1965 Graduierung zum Diplomchemiker
- 1965 - 1968 Wissenschaftlicher Mitarbeiter von Professor Dr. H. Tuppy am Institut für Biochemie der Universität Wien.
10. 7. 1968 Promotion zum Dr. phil. (chem.) an der Universität Wien
- 1968 - 1970 Wissenschaftlicher Mitarbeiter von Professor Dr. Dr. h.c. Th. Bücher am Institut für Physiologische Chemie der Universität München
- 1971 - 1973 Wissenschaftlicher Assistent am Institut für Zellbiologie (Vorstand: Professor Dr. F. Miller)
- Feber 1972 Vortragreise durch die USA
- 9.5. 1973 Habilitation für das Fach "Zellbiologie" an der Medizinischen Fakultät der Universität München; Ernennung zum Privatdozenten.
- Mai 1974 Beginn mit dem Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
- Sommer 1974 Forschungsaufenthalt an der University of California in San Francisco
1. 3. 1975 Ernennung zum Universitätsdozenten
- Mai 1976 Vortragsreise durch die USA und Canada
1. 10. 1976 Ernennung zum Wissenschaftlichen Rat
- Mai 1979 Abschluß des Medizinstudiums mit Absolvierung des Praktischen Jahres und des 3. Teil der Ärztlichen Prüfung einschließlich der mündlichen Staatsexamensprüfung.

SOCHOR DRUCK
INTERNATIONAL PRINTERS

